

REC'D 15 AUG 2003

Rec'd PCT/PTO 29 SEP 2004
PCT/JP03/03846

WIPO PCT

日本国特許庁

29.07.03

BEST AVAILABLE COPY JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2002年 7月10日

出願番号

Application Number:

特願2002-201344

[ST.10/C]:

[JP2002-201344]

出願人

Applicant(s):

独立行政法人産業技術総合研究所

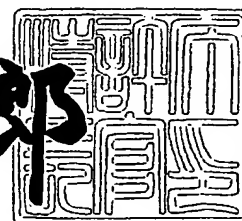
**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 6月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

太田信一郎



出証番号 出証特2003-3050209

【書類名】 特許願

【整理番号】 236-02237

【提出日】 平成14年 7月10日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 成松 久

【発明者】

 【住所又は居所】 茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

 【氏名】 工藤 崇

【特許出願人】

 【識別番号】 301021533

 【氏名又は名称】 独立行政法人産業技術総合研究所

 【代表者】 吉川 弘之

 【電話番号】 0298-61-3280

【先の出願に基づく優先権主張】

 【出願番号】 特願2002- 94772

 【出願日】 平成14年 3月29日

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 新規ガラクトース転移酵素、そのペプチド及びこれをコードする核酸

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ガラクトース転移酵素をコードする下記（a）から（d）のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

（a）配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（b）配列番号：1または18に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

（c）配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（d）配列番号：1または18に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

【請求項2】 配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項3】 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドを含むベクター

【請求項4】 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドまたは請求項3に記載のベクターを保持する宿主細胞。

【請求項5】 請求項1または2に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド。

【請求項6】 請求項4に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、請求項5に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項7】 請求項5に記載のポリペプチドに結合する抗体。

【請求項8】 請求項5に記載のポリペプチドの活性または発現を増加させる必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記（a）から（c）

に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

- (a) 請求項 1 または 2 に記載のポリヌクレオチド
- (b) 請求項 3 に記載のベクター
- (c) 請求項 5 に記載のポリペプチド

【請求項 9】 請求項 5 に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記 (a) または (b) に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物。

- (a) 請求項 7 に記載の抗体
- (b) 生体内において、内因性の請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチド

【請求項 10】 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項 5 に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニング方法であって、

- (a) 被験化合物と請求項 5 に記載のポリペプチドとを接触させる工程、
- (b) 請求項 5 に記載のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を測定する工程、
- (c) 被験化合物を接触させない場合と比較して、ガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物を選択する工程、を含む方法。

【請求項 11】 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項 5 に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子またはその発現制御領域の変異を検出することを含む方法。

【請求項 12】 以下の (a) ～ (d) の工程を含む、請求項 11 に記載の検査方法。

- (a) 被検者から DNA 試料を調製する工程
- (b) 請求項 5 に記載のポリペプチドをコードする DNA またはその発現制御領域を単離する工程
- (c) 単離した DNA の塩基配列を決定する工程
- (d) 工程 (c) により決定した DNA の塩基配列を、対照と比較する工程。

【請求項 13】 以下の（a）～（d）の工程を含む、請求項 11 に記載の検査方法。

- （a）被検者からDNA試料を調製する工程
- （b）調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程
- （c）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
- （d）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

【請求項 14】 以下の（a）～（e）の工程を含む、請求項 11 に記載の検査方法。

- （a）被検者からDNA試料を調製する工程
- （b）請求項 5 に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を増幅する工程
- （c）増幅したDNAを制限酵素により切断する工程
- （d）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程
- （e）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

【請求項 15】 以下の（a）～（e）の工程を含む、請求項 11 に記載の検査方法。

- （a）被検者からDNA試料を調製する工程
- （b）請求項 5 に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を増幅する工程
- （c）増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程
- （d）解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程
- （e）分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

【請求項 16】 以下の（a）～（d）の工程を含む、請求項 11 に記載の検査方法。

- （a）被検者からDNA試料を調製する工程
- （b）請求項 5 に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を増幅する工程
- （c）増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程
- （d）分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

【請求項17】 請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子の発現量を検出することを含む方法。

【請求項18】 以下の(a)～(c)の工程を含む、請求項17に記載の検査方法。

(a) 被検者からRNA試料を調製する工程

(b) 該RNA試料に含まれる請求項5に記載のポリペプチドをコードするRNAの量を測定する工程

(c) 測定されたRNAの量を対照と比較する工程

【請求項19】 以下の(a)～(d)の工程を含む、請求項17に記載の検査方法。

(a) 被検者から調製したcDNA試料、および請求項5に記載のポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程

(b) 該cDNA試料と該基板を接触させる工程

(c) 該cDNA試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該cDNA試料に含まれる請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する工程

(d) 測定された請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する工程

【請求項20】 以下の(a)～(c)の工程を含む、請求項17に記載の検査方法。

(a) 被検者からタンパク質試料を調製する工程

(b) 該タンパク質試料に含まれる請求項5に記載のポリペプチドの量を測定する工程

(c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程

【請求項21】 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、請求項11～20のいずれかに記載の検査方法。

【請求項22】 請求項5に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはそ

の発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項23】 請求項22に記載のオリゴヌクレオチドを含む、請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項5に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

【請求項24】 請求項7に記載の抗体を含む、請求項5に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または請求項5に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬。

【請求項25】 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、請求項23または24に記載の検査薬。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規ガラクトース転移酵素、および該酵素をコードするポリヌクレオチド、並びにこれら分子の用途に関する。

【0002】

【従来の技術】

複合糖質には、糖タンパク質と糖脂質がある。糖タンパク質には、ペプチドの種類と糖の結合様式によってN結合型糖鎖（アスパラギン結合型糖鎖）とO結合型糖鎖（ムチン型糖鎖）とプロテオグリカンの3種類に大別される。O結合型糖鎖は、セリンおよびスレオニンにO-グリコシド結合を介して糖が転移される。その糖の種類は、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)が主であるが、フコース(Fuc)、マンノース(Man)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)なども転移される。それらの糖がまずペプチドに転移して、さらに様々な糖転移酵素によってO結合型糖鎖が伸長していく。最初に転移される糖がGalNAcの場合、2番目および3番目の糖の種類、結合様式の違いによって、異なるコア構造が形成される。8種類のコア構造の存在が知られており、その構造は図7に示す。コア1構造(Gal β 1-3GalNAc α 1-ペプチド)は、別名Thomsen-Friedenreich抗原とも言われており、生体内

のほとんどの組織および細胞で発現している。この抗原はTn抗原(GalNAc α 1-ペプチドやSTn抗原(シアリルTn抗原(NeuAc α 2-6GalNAc α 1-ペプチド))と共に乳癌、膀胱癌、大腸癌などで癌関連糖鎖抗原として有名である。このコア1構造の生合成に必要なコア1 β 1,3-ガラクトース転移酵素(GalNAc α 1-ペプチドのGalNAcに β 1,3結合でガラクトースを転移する酵素)が、IgA腎症やTn症候群などの疾病において何らかの理由で酵素活性低下あるいは欠損している報告が多数存在する。

【0003】

このようにガラクトース転移酵素の異常は、種々の疾患と関連しており、病因の解明、治療法の開発にとって、ガラクトース転移酵素についての解析が望まれていた。また、新規なガラクトース転移酵素を同定することができれば、さらなる該酵素と疾病との関連性を明らかにできるものと期待される。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、新規ガラクトース転移酵素を同定することにある。

【0005】

また、本発明は、このようにして同定された新規ガラクトース転移酵素の用途を提供することをも目的とする。新規ガラクトース転移酵素の好ましい用途の一つの態様として、該酵素の変異や発現異常を指標とした、該酵素に起因する疾患の検査方法を提供する。さらに、該酵素の活性を指標とすることにより、該酵素に起因する疾患の治療のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するため、まず、既知のガラクトース転移酵素ClGal-T1をクエリーとして公共のデータベース検索を行い、ヒットしたDNA配列を基に、cDNAライブラリーからの新規ガラクトース転移酵素のクローニングを試みた。サンプルとして常法(Yuzuru Ikehara, Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999)により作製したヒト大腸腺癌細

細胞株Colo205 cDNAライブラリーを用いた。スクリーニング手法はラジオアイソトープを使用した一般的な核酸プローブによる方法を用いた。

【0007】

プローブとハイブリダイゼーションする単一のプラークを拾い、ファージを回収した後、pBluescript SK-ベクターに挿入されたcDNAクローンとして調製した。次いで、該cDNAクローンの塩基配列を決定した。該cDNAは、957bpのORFからなり、318アミノ酸をコードすることが判明した。該ORFによってコードされるタンパク質のアミノ酸配列とクエリーに使用したC1Gal-T1のアミノ酸配列は、30%未満のホモロジーしか持たず、本発明者らはこのタンパク質を「C1Gal-T2」と名付けた。アミノ酸配列の解析から、ほとんどの糖転移酵素に見られる典型的な2型の膜タンパク質であることが示唆された。

【0008】

また、C1Gal-T2の受容体基質の探索を行ったところ、pNp- α -GalNAcに対し強い反応が示され、pNp- β -GalNAcに対し反応しないことから、C1Gal-T2はコア1糖鎖(ガラクトース β 1-3アセチルガラクトサミニル α 1-R)の合成酵素であることが示唆された。

【0009】

さらに本発明者らはガラクトースとN-アセチルガラクトサミニル α 1-Rとの結合様式について解析を行った結果、C1Gal-T2は、細胞内においてもCore1合成酵素であることが示された。

【0010】

また本発明者らは、コア1合成酵素を持たない細胞株(LSCおよびJurkat)を用いて、C1Gal-T1および本発明者らによって見出されたC1Gal-T2について遺伝子発現解析を行った。その結果、LSCおよびJurkat細胞株では、C1Gal-T2が不活性型であるために、コア1合成活性を示さないことが判明した。また、C1Gal-T1はmRNAの発現があるにもかかわらず酵素活性を検出できなかったことから、C1Gal-T2がより比活性の強いコア1合成酵素であることが示唆された。

【0011】

さらに本発明者らは、同定されたC1Gal-T2をクエリーにしてデータベース検索

を行い、アミノ酸配列レベルで約68%の相同性を有するタンパク質を見出した。該タンパク質をコードする遺伝子は、これまでのところ、そのゲノム配列情報しか知られていない。本発明者らはこの配列をC1Gal-T3と名付けた。そして本発明者らは、このC1Gal-T3がガラクトース転移酵素活性を有することを見出した。

【 0 0 1 2 】

上記の如く本発明者らは、新規なガラクトース転移酵素C1Gal-T2およびC1Gal-T3を同定することに成功し、本発明を完成させた。ガラクトース転移酵素は、生体内で重要な機能を有すると考えられ、その発現や機能の異常は、種々の疾患の原因となり得る。このため、同定されたガラクトース転移酵素の活性または発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行うことも可能である。同定された新規ガラクトース転移酵素やそれらをコードするポリヌクレオチドは、これら疾患に対する好適な治療薬となるものと期待される。

【 0 0 1 3 】

本発明は、新規なガラクトース転移酵素およびその遺伝子、並びにそれらの製造及び用途に関し、より詳しくは、

〔1〕 ガラクトース転移酵素をコードする下記（a）から（d）のいずれかに記載のポリヌクレオチド、

（a）配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（b）配列番号：1または18に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド

（c）配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、付加および／または挿入したアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド

（d）配列番号：1または18に記載の塩基配列からなるDNAにストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド

〔2〕 配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチド、

〔3〕 〔1〕または〔2〕に記載のポリヌクレオチドを含むベクター、

〔４〕 〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチドまたは〔３〕に記載のベクターを保持する宿主細胞、

〔５〕 〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド、

〔６〕 〔４〕に記載の宿主細胞を培養し、該宿主細胞またはその培養上清から、産生させたポリペプチドを回収する工程を含む、〔５〕に記載のポリペプチドの製造方法、

〔７〕 〔５〕に記載のポリペプチドに結合する抗体、

〔８〕 〔５〕に記載のポリペプチドの活性または発現を増加させる必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記（ａ）から（ｃ）に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物、

（ａ）〔１〕または〔２〕に記載のポリヌクレオチド

（ｂ）〔３〕に記載のベクター

（ｃ）〔５〕に記載のポリペプチド

〔９〕 〔５〕に記載のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物であって、下記（ａ）または（ｂ）に記載の分子を治療上有効な量含む医薬組成物、

（ａ）〔７〕に記載の抗体

（ｂ）生体内において、内因性の〔５〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチド

〔１０〕 〔５〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔５〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニング方法であって、

（ａ）被験化合物と〔５〕に記載のポリペプチドとを接触させる工程、

（ｂ）〔５〕に記載のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を測定する工程、

（ｃ）被験化合物を接触させない場合と比較して、ガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物を選択する工程、を含む方法、

〔１１〕 〔５〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または

〔5〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子またはその発現制御領域の変異を検出することを含む方法、

〔12〕 以下の（a）～（d）の工程を含む、〔11〕に記載の検査方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程

（b）〔5〕に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を単離する工程

（c）単離したDNAの塩基配列を決定する工程

（d）工程（c）により決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する工程、

〔13〕 以下の（a）～（d）の工程を含む、〔11〕に記載の検査方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程

（b）調製したDNA試料を制限酵素により切断する工程

（c）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

（d）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

〔14〕 以下の（a）～（e）の工程を含む、〔11〕に記載の検査方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程

（b）〔5〕に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を増幅する工程

（c）増幅したDNAを制限酵素により切断する工程

（d）DNA断片をその大きさに応じて分離する工程

（e）検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する工程

〔15〕 以下の（a）～（e）の工程を含む、〔11〕に記載の検査方法、

（a）被検者からDNA試料を調製する工程

（b）〔5〕に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を増幅する工程

（c）増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる工程

（d）解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する工程

（e）分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程

〔16〕 以下の（a）～（d）の工程を含む、〔11〕に記載の検査方法、

- (a) 被検者からDNA試料を調製する工程
 - (b) [5]に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域を増幅する工程
 - (c) 増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する工程
 - (d) 分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する工程
- [17] [5]に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常に関連した疾患の検査方法であって、被検者における該遺伝子の発現量を検出することを含む方法、
- [18] 以下の(a)～(c)の工程を含む、[17]に記載の検査方法、
- (a) 被検者からRNA試料を調製する工程
 - (b) 該RNA試料に含まれる[5]に記載のポリペプチドをコードするRNAの量を測定する工程
 - (c) 測定されたRNAの量を対照と比較する工程
- [19] 以下の(a)～(d)の工程を含む、[17]に記載の検査方法、
- (a) 被検者から調製したcDNA試料、および[5]に記載のポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズするヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する工程
 - (b) 該cDNA試料と該基板を接触させる工程
 - (c) 該cDNA試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該cDNA試料に含まれる[5]に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する工程
 - (d) 測定された[5]に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する工程
- [20] 以下の(a)～(c)の工程を含む、[17]に記載の検査方法、
- (a) 被検者からタンパク質試料を調製する工程
 - (b) 該タンパク質試料に含まれる[5]に記載のポリペプチドの量を測定する工程
 - (c) 測定されたポリペプチドの量を対照と比較する工程
- [21] 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、[11]～[20]のいずれ

かに記載の検査方法、

〔22〕 〔5〕に記載のポリペプチドをコードするDNAまたはその発現制御領域にハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチド、

〔23〕 〔22〕に記載のオリゴヌクレオチドを含む、〔5〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔5〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬、

〔24〕 〔7〕に記載の抗体を含む、〔5〕に記載のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または〔5〕に記載のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬、

〔25〕 疾患がIgA腎症またはTn症候群である、〔23〕または〔24〕に記載の検査薬、を提供するものである。

【0014】

以下に本明細書に規定された用語の定義を示すが、これらは、本明細書中で使用される用語は理解を容易にする目的で記載されたものであり、本発明を限定する目的で用いられるべきではないことは理解されたい。

【0015】

本明細書において「ガラクトース転移酵素」とは、UDPガラクトースを供与体として、ガラクトースを糖、スフィンゴシン、セラミド、ジアシルグリセロール、ヒドロキシリシン等のヒドロキシル基に転移させる酵素を指す。

【0016】

本明細書において用いられる「ポリヌクレオチド」とは、リボヌクレオチドもしくはデオキシヌクレオチドであって、複数の塩基または塩基対からなる重合体を意味する。ポリヌクレオチドには、一本鎖型および二本鎖型のDNAを含む。ポリヌクレオチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾された塩基としては、例えば、トリチル化された塩基およびイノシンのような特殊な塩基がある。

【0017】

本明細書において用いられる「ポリペプチド」は、複数のアミノ酸からなる重

合体を意味する。従って、オリゴペプチドおよびタンパク質もまた、ポリペプチドの概念に含まれる。ポリペプチドは、天然に存在する状態から修飾されていないもの、および修飾されているものの双方を含む意である。修飾としては、アセチル化、アシル化、ADP-リボシル化、アミド化、フラビンの共有結合、ヘム部分の共有結合、ヌクレオチドまたはヌクレオチド誘導体の共有結合、脂質または脂質誘導体の共有結合、ホスファチジルイノシトールの共有結合、架橋、環化、ジスルフィド結合の形成、脱メチル化、共有架橋の形成、シスチンの形成、ピログルタメートの形成、ホルミル化、 γ -カルボキシル化、グリコシル化、GPIアンカー形成、ヒドロキシル化、ヨウ素化、メチル化、ミリストイル化、酸化、タンパク質分解処理、リン酸化、プレニル化、ラセミ化、セレノイル化、硫酸化、アルギニル化のようなタンパク質へのアミノ酸の転移RNA媒介付加、ユビキチン化などが含まれる。

【0018】

本明細書において「単離」とは、本来の環境（たとえば自然に発生するのであればその自然環境）から取り出された物質（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指し、その自然状態から「人の手によって」変えられたものである。「単離」とは、対象化合物に実質的に富む試料中に存在する化合物および／または対象化合物が部分的または実質的に精製されている試料中に存在する化合物を含むことを意味する。ここで「実質的に精製した」という用語は、その天然の環境から切り離されて、天然に関連している他の成分を少なくとも60%、好ましくは75%、および最も好ましくは90%含まない化合物（例えば、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド）を指す。

【0019】

本明細書において用いられる「変異」とは、アミノ酸配列におけるアミノ酸の変化または塩基配列における塩基の変化（すなわち単一または複数のアミノ酸またはヌクレオチド置換、欠失、付加または挿入）を指す。従って、本明細書において用いられる「変異体」は、一つ以上のアミノ酸が変化しているアミノ酸配列または一つ以上の塩基が変化している塩基配列を指す。この変異体の塩基配列の変化は、基準ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配

列を変更しても、しなくてもよい。変異体はアレリック変異体のように天然に存在するものでも、天然に存在することが知られていない変異体であってもよい。変異体は、置換されたアミノ酸が類似の構造的または化学的特性を有する保存的变化を有しうる。まれに、変異体は、非保存的置換を有しうる。生物学的または免疫学的活性を阻害することなく、いずれの、およびどれほど多くのアミノ酸残基を置換、挿入、または欠失するかを決定する手引きは、当技術分野において周知のコンピュータープログラム、例えばDNAスター・ソフトウェアを用いて発見することができる。

【0020】

「欠失」はその中で1つ以上のアミノ酸またはヌクレオチド残基がそれぞれ、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して存在しない、アミノ酸またはヌクレオチド配列のいずれかの変化である。

【0021】

「挿入」または「付加」は、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、それぞれアミノ酸またはヌクレオチド残基1つ以上が付加されたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

【0022】

「置換」とは、天然に存在するガラクトース転移酵素またはガラクトース転移酵素関連ポリペプチドのアミノ酸配列またはヌクレオチド配列と比較して、アミノ酸またはヌクレオチド1つ以上がそれぞれ異なるアミノ酸またはヌクレオチドに入れ替えられたアミノ酸またはヌクレオチド配列の変化である。

【0023】

本明細書において用いられる「ハイブリダイズ」とは、核酸鎖が塩基対形成を通じて相補鎖と結合するプロセスを意味する。

【0024】

本明細書で用いられる「治療」とは、概して、薬理的なおよび／または生理学的な効果を得ることを意味する。効果とは、疾患や症状を完全にあるいは部分

的に妨げる点で予防的であってもよく、疾患の症状を完全にあるいは部分的に治療する点で治療的であっても良い。本明細書で用いられる「治療」という用語は、哺乳類、特にヒトにおける疾患の治療すべてを含んでいる。そしてさらに、疾患の素因があるが未だ発病していると診断されていない被検者の発病の予防、疾患の進行を抑制すること、または疾患を軽減させることなどもこの用語に含まれる。

【0025】

【発明の実施の形態】

＜ポリペプチド＞

本発明は、ガラクトース転移酵素をコードする新規なポリペプチドを提供する。本発明に含まれる、本発明者らにより同定された新規ガラクトース転移酵素C1Gal-T2をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：1に、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：2に示す。また、本発明者らにより同定された新規ガラクトース転移酵素C1Gal-T3をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を配列番号：18に、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドのアミノ酸配列を配列番号：19に示す。

【0026】

本発明は、また、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを提供する。ここで「機能的に同等」とは、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有していることを意味する。ガラクトース転移酵素が持つ生物学的特性としては、ガラクトースを糖、スフィンゴシン、セラミド、ジアシルグリセロール、ヒドロキシリシン等のヒドロキシル基に転移させる活性（ガラクトース転移酵素活性）が挙げられる。本発明の好ましい態様においては、GalNAc α 1-ペプチドのGalNAcに β 1,3結合でガラクトースを転移させる酵素活性（コア1 β 1,3-ガラクトース転移酵素活性）を例示することができる。

【0027】

従って、対象となるポリペプチドが本発明者らにより同定されたポリペプチドと同等の生物学的特性を有しているか否かの判定は、当業者においては周知の方

法によってガラクトース転移酵素活性を測定することにより行うことができる。例えば、放射線同位元素で標識したUDP-Galを糖供与体基質として、生成物に取り込まれる放射線の量を測定することにより行うことができる。より具体的には、後述の実施例に記載された方法により、ガラクトース転移酵素活性を測定することができる。

【 0 0 2 8 】

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の1つの態様としては、タンパク質中のアミノ酸配列に変異を導入する方法が挙げられる。このような方法には、例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 8.1-8.5))が含まれる。また、ポリペプチド中のアミノ酸の変異は、自然界において生じることもある。本発明には、このように人工的か自然に生じたものかを問わず、本発明者らにより同定されたポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号: 2または19)において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および/もしくは付加などにより変異したタンパク質であって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドが含まれる。

【 0 0 2 9 】

置換されるアミノ酸は、タンパク質の機能の保持の観点から、置換前のアミノ酸と似た性質を有するアミノ酸であることが好ましい。例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Met、Phe、Trpは、共に非極性アミノ酸に分類されるため、互いに似た性質を有すると考えられる。また、非荷電性としては、Gly、Ser、Thr、Cys、Tyr、Asn、Glnが挙げられる。また、酸性アミノ酸としては、AspおよびGluが、塩基性アミノ酸としては、Lys、Arg、Hisが挙げられる。

【 0 0 3 0 】

これらポリペプチドにおけるアミノ酸の変異数や変異部位は、その機能が保持される限り制限はない。変異数は、典型的には、全アミノ酸の10%以内であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内であり、さらに好ましくは全アミノ酸の1%以内であると考えられる。

【0031】

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを調製するための方法の他の態様としては、ハイブリダイゼーション技術あるいは遺伝子増幅技術を利用する方法が挙げられる。即ち、当業者であれば、ハイブリダイゼーション技術 (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. Jhon Wily & Sons Section 6.3-6.4) を利用して本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNA配列 (配列番号: 1 または 18) またはその一部をもとに同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離して、該DNAから本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることは、通常行いうることである。このように本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNAとハイブリダイズするDNAによりコードされるポリペプチドであって、本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドもまた本発明のポリペプチドに含まれる。

【0032】

このようなポリペプチドを単離するための生物としては、ヒト以外に、例えば、ラット、マウス、ウサギ、ニワトリ、ブタ、ウシ等が挙げられるが、これらに制限されない。

【0033】

本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードするDNAを単離するためのストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素 (例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など) を適宜組み合わせることにより、上記と同様のスト

リンジェンシーを実現することが可能である。

【0034】

このようなハイブリダイゼーション技術を利用して単離されるDNAがコードするポリペプチドは、通常、本発明者らにより同定されたポリペプチドとアミノ酸配列において高い相同性を有する。高い相同性とは、少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、さらに好ましくは少なくとも95%以上、さらに好ましくは少なくとも97%以上（例えば、98～99%）の配列の相同性を指す。アミノ酸配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sei. USA 87:2264-2268, 1990、Proc. Natl. Acad. Sei. USA 90:5873-5877, 1993)によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol.215:403-410, 1990)。BLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターはたとえば score = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

【0035】

また、遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を用いて本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNA配列（配列番号：1または18）の一部を基にプライマーを設計し、本発明者らにより同定されたポリペプチドをコードするDNA配列と相同性の高いDNA断片を単離し、該DNAを基に本発明者らにより同定されたポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドを得ることも可能である。

【0036】

本発明のポリペプチドは「成熟」タンパク質の形であっても、融合タンパク質のような、より大きいタンパク質の一部であってもよい。本発明のポリペプチドには、分泌すなわちリーダー配列、プロ配列、多重ヒスチジン残基のような精製に役立つ配列、または組換え生産の際の安定性を確保する付加的配列などが含ま

れていてもよい。

【0037】

<ポリペプチドの断片>

本発明は、また、本発明のポリペプチドの断片を提供する。こうした断片は全体的に前記本発明のポリペプチドのアミノ酸配列の一部と同一であるが、全部とは同一でないアミノ酸配列を有するポリペプチドである。本発明のポリペプチド断片は、通常、8アミノ酸残基以上、好ましくは12アミノ酸残基以上（例えば、15アミノ酸残基以上）の配列からなるポリペプチド断片である。好適な断片としては、例えば、アミノ末端を含む一連の残基もしくはカルボキシル末端を含む一連の残基の欠失、またはアミノ末端を含む一連の残基とカルボキシル末端を含む一連の残基の二連の残基の欠失したアミノ酸配列を有するトランケーション(truncation)ポリペプチドが含まれる。また、 α ヘリックスと α ヘリックス形成領域、 β シートと β シート形成領域、ターンとターン形成領域、コイルとコイル形成領域、親水性領域、疎水性領域、 α 両親媒性領域、 β 両親媒性領域、可変性領域、表面形成領域、基質結合領域、および高抗原指数領域を含む断片のような、構造的または機能的特性により特徴づけられる断片も好適である。その他の好適な断片は生物学的に活性な断片である。生物学的に活性な断片は、同様の活性をもつ断片、その活性が向上した断片、または望ましくない活性が減少した断片を含めて、本発明のポリペプチドの活性を媒介するものである。さらに、動物、特にヒトにおいて抗原性または免疫原性がある断片も含まれる。これらのポリペプチド断片は、抗原活性を含めた本発明のポリペプチドの生物学的活性を保持することが好ましい。特定された配列および断片の変異型も本発明の一部を構成する。好適な変異型は同類アミノ酸置換により対象物と異なるもの、すなわち、ある残基が同様の性質の他の残基で置換されているものである。典型的なこうした置換は、Ala, Val, LeuとIleの間、SerとThrの間、酸性残基 AspとGluの間、AsnとGlnの間、塩基性残基 LysとArgの間、または芳香族残基 PheとTyrの間で起こる。

【0038】

<ポリペプチドの製造>

本発明のポリペプチドは任意の適当な方法で製造することができる。このよう

なポリペプチドには、単離された天然に存在するポリペプチド、組換え的に生産されたポリペプチド、合成的に製造されたポリペプチド、またはこれらの方法の組み合わせにより製造されたポリペプチドが含まれる。このようなポリペプチドの製造のための手段は当業界でよく理解されている。組み換え的なポリペプチドは、例えば、本発明のポリヌクレオチドを挿入したベクターを適当な宿主細胞に導入し、形質転換体内で発現したポリペプチドを精製することにより調製することが可能である。一方、天然由来のポリペプチドは、例えば、後述する本発明のポリペプチドに対する抗体を結合したアフィニティーカラムを利用して調製することができる (Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 16.1-16.19)。アフィニティー精製に用いる抗体は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。また、インビトロトランスレーション (例えば、「On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. Dasso, M.C., Jackson, R.J. (1989) NAR 17:3129-3144」参照) などにより本発明のポリペプチドを調製することも可能である。本発明のポリペプチドの断片は、例えば、本発明のポリペプチドを適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。

【 0 0 3 9 】

<ポリヌクレオチド>

本発明は、また、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドには、配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、配列番号：1または18に記載の塩基配列のコード領域を含むポリヌクレオチド、遺伝コードの縮重により配列番号：1または18に記載の塩基配列と異なる塩基配列からなるが配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列からなるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。本発明のポリヌクレオチドには、さらに、これらポリヌクレオチドがコードするポリペプチドと機能的に同等なポリペプチドをコードし、該ポリヌクレオチドの配列とその全長において少なくとも40%以上、好ましくは60%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、

さらに好ましくは95%以上、さらに好ましくは97%以上（例えば、98～99%）同一である塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。塩基配列の同一性は、例えば、Karlin and Altschul によるアルゴリズムBLAST (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877, 1993) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNと呼ばれるプログラムが開発されている(Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990)。BLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターはたとえばscore = 100、wordlength = 12とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。本発明のポリヌクレオチドには、上記のポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な塩基配列を有するポリヌクレオチドが含まれる。

【0040】

本発明のポリヌクレオチドは、標準的なクローニングおよびスクリーニングにより、例えば、細胞中のmRNAから誘導されたcDNAライブラリーから得ることができる。また、本発明のポリヌクレオチドはゲノムDNAライブラリーのような天然源から得ることができ、商業的に入手可能な公知の技法を用いて合成することもできる。

【0041】

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1または18）と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、例えば、ハイブリダイゼーション技術（Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.3-6.4）や遺伝子増幅技術（PCR）（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 6.1-6.4）を利用して調製することができる。即ち、ハイブリダイゼーション技術を利用して、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1または18）またはその一部をもとに同種または異種生物由来のDNA試料から、これと相同性の高いDNAを単離することができる。また、遺伝子増幅技術を用いて、本発明者らにより同定

されたポリヌクレオチドの配列（配列番号：1または18）の一部を基にプライマーを設計し、該ポリヌクレオチドの配列と相同性の高いポリヌクレオチドを単離することができる。従って、本発明には、配列番号：1または18に記載の塩基配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが含まれる。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、通常「1xSSC、0.1% SDS、37℃」程度の条件であり、より厳しい条件としては「0.5xSSC、0.1% SDS、42℃」程度の条件であり、さらに厳しい条件としては「0.2xSSC、0.1% SDS、65℃」程度の条件である。このようにハイブリダイゼーションの条件が厳しくなるほどプローブ配列と高い相同性を有するDNAの単離を期待しうる。但し、上記SSC、SDSおよび温度の条件の組み合わせは例示であり、当業者であれば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを決定する上記若しくは他の要素（例えば、プローブ濃度、プローブの長さ、ハイブリダイゼーション反応時間など）を適宜組み合わせることにより、上記と同様のストリンジェンシーを実現することが可能である。

【0042】

本発明者らにより同定されたポリヌクレオチドの配列と有意な相同性を有する塩基配列からなるポリヌクレオチドは、配列番号：1または18に記載の塩基配列に変異を導入する方法（例えば、部位特異的変異誘発法(Current Protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons Section 8.1-8.5))を利用して調製することもできる。また、このようなポリヌクレオチドは、自然界における変異により生じることもある。本発明には、このような塩基配列の変異により、配列番号：2または19に記載のアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入および／もしくは付加などされたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが含まれる。

【0043】

本発明のポリヌクレオチドを本発明のポリペプチドの組換え生産のために用いる場合、そのポリヌクレオチドには、成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片単独、他のコード配列（例えば、リーダーもしくは分泌配列、プレ-、プロ-もしくはプレプロ-タンパク質配列、または他の融合ペプチド部分をコードする

もの)と同じリーディングフレーム内にある成熟ポリペプチドのコード配列またはその断片が含まれる。例えば、融合ポリペプチドの精製を容易にするマーカー配列がコードされ得る。本発明のこの態様の好ましい具体例として、マーカー配列は、pcDNA3.1/Myc-Hisベクター(Invitrogen社)により提供されかつGentzら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1989) 86:821-824に記載されるようなヘキサ-ヒスチジンペプチド、またはMycタグである。また、このポリヌクレオチドは5'および3'非コード配列、例えば、転写されるが翻訳されない配列、スプライシングおよびポリアデニル化シグナル、リボソーム結合部位、およびmRNA安定化配列を含んでいてもよい。

【0044】

＜プローブ・プライマー・アンチセンス・リボザイム＞

本発明は、本発明者らにより同定されたポリヌクレオチド（配列番号：1もしくは18に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドまたはその相補鎖）に相補的な、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T（ただしRNAの場合はU）、G:Cの塩基対からなる2本鎖核酸の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。相同性を決定するためのアルゴリズムは本明細書に記載したものを使用すればよい。このようなヌクレオチドは、本発明のポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15~100ヌクレオチド、好ましくは15~35ヌクレオチドの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のDNAの少なくとも一部若しくは全部の配列を含む少なくとも15ヌクレオチド、好ましくは少なくとも30ヌクレオチドの鎖長のヌクレオチドが用いられる。このようなヌクレオチドは、好ましくは本発明のポリペプチドをコードするDNAに特異的にハイブリダイズするものである。「特異的にハイブリダイズする」とは、通常のハイブリダイゼーション条件下、好ましくはストリンジェントな条件下で

、本発明者らにより同定されたヌクレオチド（配列番号：1または18）とハイブリダイズし、他のポリペプチドをコードするDNAとはハイブリダイズしないことを意味する。

【0045】

これらヌクレオチドは、本発明のポリペプチドの活性の異常や該ポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常を検査・診断するために利用できる。

【0046】

また、これらヌクレオチドには、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドが含まれる。このようなポリヌクレオチドには、アンチセンスポリヌクレオチド（アンチセンスDNA/RNA；本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物と相補的なアンチセンスRNA、および該RNAをコードするDNA）やリボザイム（本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写産物を特異的に開裂するリボザイム活性を有するRNAをコードするDNA）が含まれる。

【0047】

アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNAポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつあるRNAとのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNAとのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNAの翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるペプチド鎖の伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する（平島および井上「新生化学実験講座2

核酸IV 遺伝子の複製と発現」,日本生化学会編,東京化学同人,pp.319-347,1993)

【0048】

本発明で用いられるアンチセンスポリヌクレオチドは、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子のmRNAの5'端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは3'側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセンスポリヌクレオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは3'側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。アンチセンスポリヌクレオチドの配列は、標的遺伝子またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。転写されたRNAは、標的とする遺伝子の転写産物に対して好ましくは90%以上、最も好ましくは95%以上の相補性を有する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドは、アンチセンス効果を引き起こすために、少なくとも15ヌクレオチド以上、好ましくは100ヌクレオチド、さらに好ましくは500ヌクレオチド以上の鎖長を有し、通常、3000ヌクレオチド以内、好ましくは2000ヌクレオチド以内の鎖長を有する。

【0049】

このようなアンチセンスポリヌクレオチドには、本発明のポリペプチドの異常（機能異常や発現異常）などに起因した疾患の遺伝子治療への応用も考えられる。

【0050】

シアリルルイスX糖鎖およびシアリル6スルホルイスX糖鎖は、接着分子セレクチン分子のリガンドであり、リンパ球のホーミング現象、炎症局所での白血球の血管外遊走のための血管内皮細胞への接着、癌細胞の血行性転移に関与していると言われている。これらの糖鎖抗原は、糖タンパク質および糖脂質両方に存在

しており、糖タンパク質上でもN-結合理型、O-結合理型の両方に存在する。O-結合理型糖鎖の場合、主にCore 1構造から糖鎖の伸長、分岐が生じて、非還元末端側にシアリルルイスXおよびシアリル6スルホルイスX糖鎖が存在する。よって、Core 1 構造の合成の阻害することにより、これらの糖鎖抗原の発現を抑制できる可能性がある。すなわちCore 1合成酵素(C1Gal-T) の活性または発現を抑制することにより、抗癌作用もしくは抗炎症作用が期待される。例えば、本発明のC1Gal-1-T2またはC1Gal-T3に対するアンチセンスポリヌクレオチドは、酵素活性阻害剤として、抗炎症作用および血行性転移の抑制に使用できる可能性がある。該アンチセンスポリヌクレオチドは、例えば、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、配列番号: 1または18)の配列情報を基にホスホロチオネート法(Stein, 1988 Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides. Nucleic Acids Res 16, 3209-21 (1988))などにより調製することが可能である。

【0051】

内在性遺伝子の発現の抑制は、また、リボザイムをコードするポリヌクレオチドを利用して行うことも可能である。リボザイムとは触媒活性を有するRNA分子のことをいう。リボザイムには種々の活性を有するものがあるが、中でもRNAを切断する酵素としてのリボザイムの研究により、RNAの部位特異的な切断を目的とするリボザイムの設計が可能となった。リボザイムには、グループIイントロン型や、RNasePに含まれるMIRNAのように400ヌクレオチド以上の大きさのものもあるが、ハンマーヘッド型やヘアピン型と呼ばれる40ヌクレオチド程度の活性ドメインを有するものもある(小泉誠および大塚栄子, (1990) 蛋白質核酸酵素, 35: 2191)。

【0052】

例えば、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断ドメインは、G13U14C15のC15の3'側を切断するが、活性にはU14が9位のAと塩基対を形成することが重要とされ、15位の塩基はCの他にAまたはUでも切断されることが示されている(M. Koizumiら, (1988) FEBS Lett. 228:225)。リボザイムの基質結合部を標的部位近傍のRNA配列と相補的になるように設計すれば、標的RNA中のUC、UUまたはUAという配列

を認識する制限酵素的なRNA切断リボザイムを作出することが可能である(M.Koizumiら,(1988) FEBS Lett. 239:285、小泉誠および大塚栄子,(1990) 蛋白質核酸酵素,35:2191、M.Koizumiら,(1989) Nucleic Acids Res. 17:7059)。

【0053】

また、ヘアピン型リボザイムも、本発明の目的のために有用である。ヘアピン型リボザイムは、例えばタバコリングスポットウイルスのサテライトRNAのマイナス鎖に見出される(J.M.Buzayan Nature 323:349,1986)。このリボザイムも、標的特異的なRNA切断を起こすように設計できることが示されている(Y.Kikuchi およびN.Sasaki (1992) Nucleic Acids Res. 19:6751、菊池洋,(1992) 化学と生物 30:112)。

【0054】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドは、遺伝子治療に用いる場合には、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを利用して、ex vivo法やin vivo法などにより患者へ投与を行うことが考えられる。

【0055】

また、最近の研究により、炎症に伴って血小板表面に出現する接着分子のP-セレクチンと結合する、新規の糖オリゴペプチドGSP-6が見出された(Leppanen A. et al., J. Biol. Chem. 274: 24838-24848, 1999)。GSP-6は、リンパ球のP-セレクチンへの接触を阻害する。従ってGSP-6は、セレクチンが関与する炎症反応、または癌細胞の血行性転移等を抑制する機能を有するものと考えられる。GSP-6は、抗炎症剤および抗癌剤等の開発にとって有用な分子と言える。このGSP-6の合成には、コア1糖鎖の合成酵素が必要であることから、本発明のポリペプチドは、細胞接着を阻害する糖オリゴペプチドGSP-6の合成に利用できるものと考えられ、大いに有用である。

【0056】

<ベクター、宿主細胞、ポリペプチドの製造>

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドを含有するベクター、本発明のポリ

ヌクレオチドまたは該ベクターを保持する宿主細胞、および該宿主細胞を利用した本発明のポリペプチドの生産方法を提供する。

【0057】

本発明のベクターとしては、挿入したDNAを安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター(Stratagene社製)などが好ましい。本発明のポリペプチドを生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター(プロメガ社製)、大腸菌であればpETベクター(Invitrogen社製)、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター(GenBank Accession No. AB009864)、生物個体であればpME18Sベクター(Mol Cell Biol. 8:466-472(1988))などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトを用いたりガーゼ反応により行うことができる(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

【0058】

本発明のベクターが導入される宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。ポリペプチドを発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞(例:ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌)、真菌細胞(例:酵母、アスペルギルス)、昆虫細胞(例:ドロソフィラS2、スポドプテラSF9)、動物細胞(例:CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowesメラノーマ細胞)および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法(Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9)、リポフェクタミン法(GIBCO-BRL社製)、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。

【0059】

宿主細胞において発現したポリペプチドを小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的のポリペプチドに組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。

【0060】

本発明のポリペプチドの回収は、本発明のポリペプチドが培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明のポリペプチドが細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後ポリペプチドを回収する。

【0061】

組換え細胞培養物から本発明のポリペプチドを回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

【0062】

<検査方法>

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査方法を提供する。ガラクトース転移酵素は、生体内で重要な機能を有すると考えられ、その発現や機能の異常は、種々の疾患の原因となり得る。従って、本発明のポリペプチドの不適當な活性または発現を指標とすることにより、このような疾患の検査を行うことも可能である。

【0063】

本発明において「疾患の検査」とは、疾患の症状を呈している被検者の治療戦略を立てるための検査のみならず、被検者が疾患にかかりやすいか否かを判断するために行う予防のための検査、または既に罹患しているか否かの検査も含まれる。

【0064】

最近の研究から、IgA腎症やTn症候群などの疾病において、ガラクトース転移酵素活性が低下あるいは欠損しているとの報告が多数なされている。従って、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常によって、例えば、IgA腎症、Tn症候群等の疾患が引き起こされることも十分考えられる。本発明において、「本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患」とは、例えば、IgA腎症、Tn症候群等を例示することができる。

【0065】

本発明の検査方法の一つの態様は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域における変異を検出することを含む方法である。

【0066】

一つの方法は、被検者における本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域の塩基配列を直接決定することによって検査を行う方法である。この方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。DNA試料は、被検者の細胞、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料から抽出した染色体DNAあるいはRNAを基に調製することができる。染色体DNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えば染色体DNAを適当な制限酵素で切断し、ベクターにクローニングして、ゲノムライブラリーを作製すればよい。RNAから本方法のDNA試料を調製するには、例えば、逆転写酵素を用いて、RNAからcDNAライブラリーを作製すればよい。本方法においては、次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを単離する。該DNAの単離は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズするプローブを用いて、ゲノムライブラリーやcDNAライブラリーのスクリーニングをすることにより行うことができる。また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズするプライマーを用いて、ゲノムDNAライブラリー、cDNAライブラリー、あるいはRNAを鋳型としたPCRによって単離することもできる。本方法においては、次いで、単離したDNAの塩基配列を決定する。選択したDNAの塩基配列の決定は、当業者に公知

の方法で行うことができる。本方法においては、次いで、決定したDNAの塩基配列を、対照と比較する。本方法における「対照」とは、正常な（野生型の）本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAの塩基配列を言う。このような比較の結果、被検者のDNAの塩基配列が対照と異なっていた場合には、被検者は、疾患に罹患しているまたは発症の危険があると判定される。

【0067】

本発明の検査方法は、上記の如く直接被検者由来のDNAの塩基配列を決定する方法以外に、種々の方法を用いることができる。

【0068】

その一つの方法においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、調製したDNA試料を制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。また、他の一つの態様においては、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを制限酵素により切断する。次いで、DNA断片をその大きさに応じて分離する。次いで、検出されたDNA断片の大きさを、対照と比較する。

【0069】

このような方法としては、例えば、制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism/RFLP）を利用した方法やPCR-RFLP法等が挙げられる。具体的には、制限酵素の認識部位に変異が存在する場合、あるいは制限酵素処理によって生じるDNA断片内に塩基挿入または欠失がある場合、制限酵素処理後に生じる断片の大きさが対照と比較して変化する。この変異を含む部分をPCR法によって増幅し、それぞれの制限酵素で処理することによって、これらの変異を電気泳動後のバンドの移動度の差として検出することができる。あるいは、染色体DNAをこれらの制限酵素によって処理し、電気泳動した後、本発明のプロープDNAを用いてサザンブロッティングを行うことにより、変異の有無を検出することができる。用いられる制限酵素は、それぞれの変異に応じて適宜選択することが

できる。この方法では、ゲノムDNA以外にも被検者から調製したRNAを逆転写酵素でcDNAにし、これをそのまま制限酵素で切断した後、サザンブロッティングを行うことも可能である。また、このcDNAを鋳型としてPCRで本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅し、それを制限酵素で切断した後、移動度の差を調べることも可能である。

【0070】

別の方法は、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを一本鎖DNAに解離させる。次いで、解離させた一本鎖DNAを非変性ゲル上で分離する。分離した一本鎖DNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【0071】

このような方法としては、例えばPCR-SSCP(single-strand conformation polymorphism、一本鎖高次構造多型)法(Cloning and polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis of anonymous Alu repeats on chromosome 11. Genomics. 1992 Jan 1; 12(1): 139-146.、Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products. Oncogene. 1991 Aug 1; 6(8): 1313-1318.)が挙げられる。この方法は操作が比較的簡便であり、また被検試料の量も少なく済む等の利点を有するため、特に多数のDNA試料をスクリーニングするのに好適である。その原理は次の通りである。二本鎖DNA断片を一本鎖に解離すると、各鎖はその塩基配列に依存した独自の高次構造を形成する。この解離したDNA鎖を、変性剤を含まないポリアクリルアミドゲル中で電気泳動すると、それぞれの高次構造の差に応じて、相補的な同じ鎖長の一本鎖DNAが異なる位置に移動する。一塩基の置換によってもこの一本鎖DNAの高次構造は変化し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において異なる移動度を示す。従って、この移動度の変化を検出することによりDNA断片に点突然変異や欠失、あるいは挿入等による変異が存在することを検出することができる。

【0072】

具体的には、まず、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAをPCR法等によって増幅する。増幅される範囲としては、通常200～400bp程度の長さが好ましい。PCRは、当業者においては反応条件等を適宜選択して行うことができる。PCRの際に、 ^{32}P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識したプライマーを用いることにより、増幅DNA産物を標識することができる。あるいはPCR反応液に ^{32}P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を加えてPCRを行うことにより、増幅DNA産物を標識することも可能である。さらに、PCR反応後にクレノウ酵素等を用いて、 ^{32}P 等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を、増幅DNA断片に付加することによっても標識を行うことができる。こうして得られた標識されたDNA断片を、熱を加えること等により変性させ、尿素などの変性剤を含まないポリアクリルアミドゲルによって電気泳動を行う。この際、ポリアクリルアミドゲルに適量（5から10%程度）のグリセロールを添加することにより、DNA断片の分離の条件を改善することができる。また、泳動条件は各DNA断片の性質により変動するが、通常、室温（20から25℃）で行い、好ましい分離が得られないときには4から30℃までの温度で最適の移動度を与える温度の検討を行う。電気泳動後、DNA断片の移動度を、X線フィルムを用いたオートラジオグラフィーや、蛍光を検出するスキャナー等で検出し、解析を行う。移動度に差があるバンドが検出された場合、このバンドを直接ゲルから切り出し、PCRによって再度増幅し、それを直接シーケンシングすることにより、変異の存在を確認することができる。また、標識したDNAを使わない場合においても、電気泳動後のゲルをエチジウムブロマイドや銀染色法などによって染色することによって、バンドを検出することができる。

【0073】

さらに別の方法は、まず、被検者からDNA試料を調製する。次いで、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを増幅する。さらに、増幅したDNAを、DNA変性剤の濃度が次第に高まるゲル上で分離する。次いで、分離したDNAのゲル上での移動度を対照と比較する。

【0074】

このような方法としては、例えば、変性剤濃度勾配ゲル (denaturant gradient gel electrophoresis: DGGE法) 等を例示することができる。DGGE法は、変性剤の濃度勾配のあるポリアクリルアミドゲル中で、DNA断片の混合物を泳動し、それぞれの不安定性の違いによってDNA断片を分離する方法である。ミスマッチのある不安定なDNA断片が、ゲル中のある変性剤濃度の部分まで移動すると、ミスマッチ周辺のDNA配列はその不安定さのために、部分的に1本鎖へと解離する。この部分的に解離したDNA断片の移動度は、非常に遅くなり、解離部分のない完全な二本鎖DNAの移動度と差がつくことから、両者を分離することができる。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を含むDNAを本発明のプライマー等を用いたPCR法等によって増幅し、これを尿素などの変性剤の濃度が移動するに従って徐々に高くなっているポリアクリルアミドゲル中で電気泳動し、対照と比較する。変異が存在するDNA断片の場合、より低い変性剤濃度位置でDNA断片が一本鎖になり、極端に移動速度が遅くなるため、この移動度の差を検出することにより変異の有無を検出することができる。

【0075】

上記の方法以外にも、特定位置の変異のみを検出する目的にはアレル特異的オリゴヌクレオチド (Allele Specific Oligonucleotide/ASO) ハイブリダイゼーション法が利用できる。変異が存在すると考えられる塩基配列を含むオリゴヌクレオチドを作製し、これと試料DNAでハイブリダイゼーションを行わせると、変異が存在する場合、ハイブリッド形成の効率が低下する。それをサザンブロット法や、特殊な蛍光試薬がハイブリッドのギャップにインターカレーションすることにより消光する性質を利用した方法、等により検出することができる。また、リボヌクレアーゼAミスマッチ切断法による検出も可能である。具体的には、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子を含むDNAをPCR法等によって増幅し、これをプラスミドベクター等に組み込んだ対照cDNA等から調製した標識RNAとハイブリダイゼーションを行う。変異が存在する部分においてはハイブリッドが一本鎖構造となるので、この部分をリボヌクレアーゼAによって切断し、これをオートラジオグラフィ等で検出することによって変異の存在を検出することができる。

【0076】

本発明の検査方法の他の態様は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を検出することを含む方法である。ここで「遺伝子の発現」には、転写および翻訳が含まれる。従って、「発現産物」には、mRNAおよびタンパク質が含まれる。

【0077】

本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査法においては、まず、被検者からRNA試料を調製する。次いで、該RNA試料に含まれる本発明のポリペプチドをコードするRNAの量を測定する。次いで、測定された本発明のポリペプチドをコードRNAの量を対照と比較する。

【0078】

このような方法としては、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプローブを用いたノーザンブロッティング法、または本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするプライマーを用いたRT-PCR法等を例示することができる。

【0079】

また、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の転写レベルにおける検査においては、DNAアレイ（新遺伝子工学ハンドブック、村松正實・山本雅、羊土社、p280-284）を利用することもできる。具体的には、まず、被検者から調製したcDNA試料、および本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズするポリヌクレオチドプローブが固定された基板を提供する。基板に固定されるポリヌクレオチドプローブは、複数種の本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出するために、複数種であってもよい。被検者からのcDNA試料の調製は、当業者に周知の方法で行うことができる。cDNA試料の調製の好ましい態様においては、まず被検者の細胞から全RNAの抽出を行う。細胞としては、例えば血液、尿、唾液、組織の生検または剖検材料の細胞などが例示できる。全RNAの抽出は、例えば次のようにして行うことができる。純度の高い全RNAが調製できる方法であれば、既存の方法およびキット等を用いることが可能である。例えばAmbion社 "RNA later" を用い前処理を行った後、ニッポンジーン社 "I

sogen”を用いて全RNAの抽出を行う。具体的方法にはそれらの添付プロトコールに従えばよい。次いで、抽出した全RNAを鋳型として、逆転写酵素を用いてcDNAの合成を行い、cDNA試料を調製する。全RNAからのcDNAの合成は、当業者に周知の方法で実施することができる。調製したcDNA試料には、必要に応じて、検出のための標識を施す。標識物質としては、検出可能なものであれば特に制限はなく、例えば、蛍光物質、放射性元素等を挙げることができる。標識は、当業者によって一般的に行われる方法(L Luo et al., Gene expression profiles of laser-captured adjacent neuronal subtypes. Nat Med. 1999, 117-122)で実施することができる。

【0080】

本発明において「基板」とは、ポリヌクレオチドを固定することが可能な板状の材料を意味する。本発明の基板は、ポリヌクレオチドを固定することが可能であれば特に制限はないが、一般にDNAアレイ技術で使用される基板を好適に用いることができる。

【0081】

DNAアレイ技術の利点は、ハイブリダイゼーションの溶液量が非常に少なく、固定されたヌクレオチドプローブに、細胞の全RNAに由来するcDNAを含む非常に複雑なターゲットをハイブリダイズすることができることである。一般にDNAアレイは、高密度に基板にプリントされた何千ものヌクレオチドで構成されている。通常これらのDNAは非透過性(non-porous)の基板の表層にプリントされる。基板の表層は、一般的にはガラスであるが、透過性(porous)の膜、例えばニトロセルロースメンブレンを使用しすることができる。ヌクレオチドの固定(アレイ)には2つのタイプがあり、一つはAffymetrix社開発によるポリヌクレオチドを基本としたアレイであり、もう一つは主としてStanford大学で開発されたcDNAのアレイである。ポリヌクレオチドのアレイにおいて、ポリヌクレオチドは通常インサイチュ(in situ)で合成される。例えば、photolithographicの技術(Affymetrix社)、および化学物質を固定させるためのインクジェット(Rosetta Inpharmatics社)技術等によるポリヌクレオチドのインサイチュ合成法が既に知られており、いずれの技術も本発明の基板の作製に利用することができる。基板に固定する

ポリヌクレオチドプローブは、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子と特異的にハイブリダイズするものであれば特に制限はない。本発明のポリヌクレオチドプローブには、ポリヌクレオチド、またはcDNAが含まれる。ここで「特異的にハイブリダイズする」とは、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと実質的にハイブリダイズし、それ以外のポリヌクレオチドとは実質的にハイブリダイズしないことを意味する。特異的なハイブリダイズが可能であれば、ポリヌクレオチドプローブは、検出の対象となるポリヌクレオチドの塩基配列に対し、完全に相補的である必要はない。基板に結合するポリヌクレオチドプローブの長さは、通常cDNAを固定する場合100～4000ベースであり、好ましくは200～4000ベースであり、さらに好ましくは500～4000ベースである。合成ポリヌクレオチドを固定する場合は、通常15～500ベースであり、好ましくは30～200ベースであり、さらに好ましくは50～200ベースである。基板へのポリヌクレオチドの固定の工程は、一般に「プリント」とも呼ばれる。具体的には、例えば以下のようにプリントすることができるが、これに限定されるものではない。数種のポリヌクレオチドプローブを4.5 mm x4.5 mmの一つの領域内にプリントする。その際、それぞれのアレイをプリントするのには一つのピンを用いて行うことが可能である。従って48ピンのツールを用いた場合、48回の繰り返したアレイを一つの標準的な顕微鏡用スライドにプリントすることが可能である。

【0082】

本方法においては、次いで、該cDNA試料と該基板を接触させる。本工程により、本発明のポリペプチドをコードするDNAと特異的にハイブリダイズ可能な基板上のヌクレオチドプローブに対し、cDNA試料をハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションの反応液および反応条件は、基板に固定するヌクレオチドプローブの長さ等の諸要因により変動しうるが、一般的に当業者に周知の方法により行うことができる。

【0083】

本方法においては、次いで、該cDNA試料と基板に固定されたヌクレオチドプローブとのハイブリダイズの強度を検出することにより、該cDNA試料に含まれる本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定する。さらに、測定され

た本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を対照と比較する。

【0084】

本発明においては、cDNA試料中に本発明のポリペプチドをコードする遺伝子由来のcDNAが存在する場合、基板に固定されたヌクレオチドプローブと該cDNAとがハイブリダイズする。従って、ポリヌクレオチドプローブと該cDNAとのハイブリダイズの強度を検出することにより、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を測定することができる。ポリヌクレオチドプローブと該cDNAとのハイブリダイズの強度の検出は、cDNA試料を標識した物質の種類に応じて当業者においては適宜行うことができる。例えば、cDNAが蛍光物質によって標識された場合、スキャナーによって蛍光シグナルを読み取ることによって検出することができる。

【0085】

本発明の方法においては、被検者および対照（健常者）由来のcDNA試料について、異なる蛍光物質で標識を施すことにより、1回の測定でそれぞれにおける本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量を同時に測定することができる。例えば、上記それぞれのcDNA試料の一方を蛍光物質であるCy5で、他方をCy3で標識することができる。それぞれの蛍光シグナルの相対強度は、被検者および対照での本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量に応じた相対量を示す（Duggan et al., Nat. Genet. 21: 10-14, 1999）。

【0086】

一方、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の翻訳レベルにおける検査においては、まず、被検者からポリペプチド試料を調製する。次いで、該ポリペプチド試料に含まれる本発明のポリペプチドの量を測定する。次いで、測定された本発明のポリペプチドの量を対照と比較する。

【0087】

このような方法としては、SDSポリアクリルアミド電気泳動法、並びに本発明のポリペプチドに結合する抗体を用いた、ウェスタンブロッティング法、ドットブロッティング法、免疫沈降法、酵素結合免疫測定法(ELISA)、および免疫蛍光法を例示することができる。

【0088】

上記の方法において、対照と比較して、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現量が有意に変化していた場合、被検者は、該遺伝子の発現異常に関連した疾患を罹患している、または該疾患を発症する危険を有すると判定される。

【0089】

<検査薬>

本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の検査薬を提供する。

【0090】

その一つの態様は、上記した本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドまたはその発現制御領域を含むDNAにハイブリダイズし、少なくとも15ヌクレオチドの鎖長を有するオリゴヌクレオチドを含む検査薬である。該オリゴヌクレオチドは、上記本発明の検査方法において、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を検出するためのプローブとして、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子またはその発現制御領域を増幅するためのプライマーとして用いることができる。本発明のオリゴヌクレオチドは、例えば市販のオリゴヌクレオチド合成機により作製することができる。プローブは、制限酵素処理等によって取得されるの二本鎖DNA断片として作製することもできる。本発明のオリゴヌクレオチドをプローブとして用いる場合は、適宜標識して用いることが好ましい。標識する方法としては、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、オリゴヌクレオチドの5'端を³²Pでリン酸化することにより標識する方法、およびクレノウ酵素等のDNAポリメラーゼを用い、ランダムヘキサマーオリゴヌクレオチド等をプライマーとして³²P等のアイソトープ、蛍光色素、またはビオチン等によって標識された基質塩基を取り込ませる方法（ランダムプライム法等）を例示することができる。

【0091】

本発明の検査薬の他の一つの態様は、後述する本発明のポリペプチドに結合する抗体を含む検査薬である。該抗体は、上記の本発明の検査方法において、本発明のポリペプチドを検出するために用いられる。抗体は、本発明のポリペプチド

を検出可能であればその形態に制限はない。検査のための抗体には、ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体が含まれる。抗体は必要に応じて標識されていてもよい。

【0092】

上記の検査薬においては、有効成分であるオリゴヌクレオチドや抗体以外に、例えば、滅菌水、生理食塩水、植物油、界面活性剤、脂質、溶解補助剤、緩衝剤、タンパク質安定剤（BSAやゼラチンなど）、保存剤等が必要に応じて混合されていてもよい。

【0093】

＜抗体＞

本発明は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を提供する。ここで「抗体」には、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、ヒト化抗体、さらにFabまたは他の免疫グロブリン発現ライブラリーの産物を含むFabフラグメントが含まれる。

【0094】

本発明のポリペプチドまたはその断片もしくは類似体、またはそれらを発現する細胞は、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するための免疫原としても使用することができる。抗体は、好ましくは、本発明のポリペプチドに免疫特異的である。「免疫特異的」とは、その抗体が他のポリペプチドに対するその親和性よりも本発明のポリペプチドに対して実質的に高い親和性を有することを意味する。

【0095】

本発明のポリペプチドに結合する抗体は、当業者に公知の方法により調製することが可能である。ポリクローナル抗体であれば、例えば、次のようにして得ることができる。本発明のポリペプチドあるいはそのGSTとの融合タンパク質をウサギ等の小動物に免疫し血清を得る。これを、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することにより調製する。また、モノクローナル抗体であれば、例えば、本発明のポリペプチドをマ

ウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これによりできた融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、本発明のポリペプチドに結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで、得られたハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、本発明のポリペプチドをカップリングしたアフィニティーカラム等により精製することで、調製することが可能である。

【0096】

本発明の抗体は、本発明のポリペプチドやこれを発現する細胞の単離、同定、および精製に利用することができる。本発明のポリペプチドに結合する抗体は、本発明のポリペプチドの活性または発現を抑制するものと考えられることから、該抗体を有効量含む組成物は、本発明のポリペプチドの活性または発現を抑制する必要がある患者を治療するための医薬組成物となるものと期待される。また、該抗体は、本発明のポリペプチドの発現異常に関連した疾患の検査において、本発明のポリペプチドの発現量を測定するために用いることもできる。

【0097】

＜治療薬候補化合物の同定＞

本発明のポリペプチドは、本発明のポリペプチドの発現異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニングにおいて使用することができる。同定の対象となるこれら分子は、天然由来であっても、人工的に合成された構造的または機能的な模擬物であってもよい。本発明のポリペプチドは多くの病理を含めて多数の生物学的機能に関与している。従って、本発明のポリペプチドを活性化する化合物および本発明のポリペプチドの活性化を阻害し得る化合物を発見することが望まれる。

【0098】

本発明は、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現の異常または本発明のポリペプチドの活性の異常に関連した疾患の治療薬候補化合物のスクリーニング方法を提供する。本方法においては、まず、本発明のポリペプチドと候補化

合物とを接触させ、次いで、本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を測定する。そして、被験化合物を接触させない場合と比較して、ガラクトース転移酵素活性を変化させる（増加または抑制させる）化合物を選択する。

【0099】

本発明の上記スクリーニング方法により本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を増加させる化合物として単離される化合物は、例えば、IgA腎症、またはTn症候群等の疾患に対する治療薬として有用である。一方、本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を抑制させる化合物として単離される化合物は、酵素活性阻害剤として、例えば、抗炎症剤、または抗癌剤として有用である。さらに、本発明のポリペプチドを結晶化することによりドラッグデザインされた化合物は、酵素活性阻害剤として使用することも可能である。また、該化合物は被験化合物として、本発明の上記スクリーニング方法に供することもできる。

【0100】

ガラクトース転移酵素活性の測定は、例えば、上述の方法により行うことができる。被検化合物としては、特に制限はなく、例えば、種々の公知化合物やペプチド（例えば、ケミカルファイルに登録されているもの）あるいはファージ・ディスプレイ法（J.Mol.Biol. (1991) 222, 301-310）などを応用して作成されたランダム・ペプチド群を用いることができる。また、微生物の培養上清や、植物、海洋生物由来の天然成分などもスクリーニングの対象となる。その他、脳をはじめとする生体組織抽出物、細胞抽出液、遺伝子ライブラリーの発現産物などが挙げられるが、これらに制限されない。

【0101】

<疾患の治療のための医薬組成物>

本発明は、本発明のポリペプチドの活性または発現を増加または抑制させる必要がある患者を治療するための医薬組成物を提供する。

【0102】

本発明のポリペプチドの活性または発現を増加させるための、医薬組成物の有効成分としては、本発明のポリヌクレオチド、本発明のポリヌクレオチドが挿入

されたベクター、本発明のポリペプチドを用いることができる。一方、本発明のポリペプチドの活性または発現を抑制させるための医薬組成物の有効成分としては、本発明のポリペプチドに対する抗体、または生体内において内因性の本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の発現を抑制するポリヌクレオチドを用いることができる。該ポリヌクレオチドとしては、上記したアンチセンスポリヌクレオチドやリボザイムが含まれる。

【0103】

治療用化合物を医薬品として用いる場合には、該化合物自体を直接患者に投与する以外に、公知の製剤学的方法により製剤化した医薬組成物として投与を行うことも可能である。例えば、薬理学上許容しうる担体（賦形剤、結合剤、崩壊剤、矯味剤、矯臭剤、乳化剤、希釈剤、溶解補助剤等）と混合して得られる医薬組成物または錠剤、丸剤、散剤、顆粒剤、カプセル剤、トローチ剤、シロップ剤、液剤、乳剤、懸濁剤、注射剤（液剤、懸濁剤等）、坐剤、吸入剤、経皮吸収剤、点眼剤、眼軟膏等の製剤として経口または非経口に適した形態で処方される。

【0104】

患者への投与は、一般的には、例えば、動脈内注射、静脈内注射、皮下注射など当業者に公知の方法により行いうる。投与量は、患者の体重や年齢、投与方法などにより変動するが、当業者であれば適当な投与量を適宜選択することが可能である。また、該化合物がDNAによりコードされうるものであれば、該DNAを遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。

【0105】

遺伝子治療用ベクターとしては、例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターなどを例示することができる。該ベクターを利用して、*ex vivo*法や*in vivo*法などにより患者へ目的のDNAの投与を行うことができる。

【0106】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施

例に制限されるものではない。

【実施例 1】 新規ガラクトース転移酵素C1Gal-T2の同定

Juらによってデータベース登録されたCore1 β 1,3-Gal-T1(AF155582)をクエリーにして公共のデータベースを検索したところ、相同性をもつ遺伝子が登録されていた。この遺伝子は、ゲノム配列(AC011890(Xq23))およびcDNA配列(AF150268, BC011930)の両方が登録されているが、それぞれの配列の不一致がわずかではあるが存在するため、cDNAライブラリーからのクローニングを選択した。用いたサンプルは常法 (Yuzuru Ikehara , Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol . 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) により作製したヒト大腸腺癌細胞株Colo205 cDNAライブラリーである。また、スクリーニング手法はラジオアイソトープを使用した一般的な核酸プローブによる方法を用いた。

【0107】

まず、ヒト大腸腺癌細胞株Colo205 cDNAライブラリーより常法に従って調製したラムダファージを鋳型とし、プライマーCB-739 (5'-gaagatctag aatgcaccac catgagcatc - 3' / 配列番号: 3) とCB-740 (5'-ataagaatgc ggccgctcag tcattgt cag aaccatttg- 3' / 配列番号: 4) を用いてPCRを行い、増幅したDNA断片878 bpをアマシャム社製Multiple DNA labeling systemを用いて³²P-dCTPで放射能ラベルした。このプローブを用いて、大腸菌上に形成されたラムダファージのプラークのうち、プローブとハイブリダイゼーションする単一のプラークを拾い、上記プライマーCB-739とCB-740を用いてPCRで目的とするDNA部位の存在を確認した。挿入が確認されたプラークより得られたファージはラムダ ZAP IIベクター (ストラタジーン社) で構築されているため (Yuzuru Ikehara , Hisashi Narimatsu et al, Glycobiology vol. 9 no. 11 pp. 1213-1224, 1999) 、付属の説明書に従った方法によりpBluescript SK-ベクターに挿入されたcDNAクローンとして調製 (Excision) することが出来る。同方法によりこれを調製し、得られたコロニーよりDNAを得た。このcDNAクローンは、SK-/C2と名付けた。その後、通常の方法に従ってcDNAクローンの1471 bpの塩基配列を決定した (配列番号: 1 ; 以下「配列1」という)。理論上のORF 957bpが得られ、このORFから318アミノ酸が推定されC1Gal-T2と名づけた (配列番号: 2) (図1)。また、104 bpの5' 非翻

訳領域と410 bpの3' 非翻訳領域が存在しており、ポリ(A)の付加は見られなかった。アミノ酸配列によりほとんどの糖転移酵素に見られる典型的な2型の膜タンパク質であることが予想された。配列1とAC011890で登録されたゲノム配列を比較検討したところ、ORF、ATGから上流5 bpと3' 非翻訳領域はひとつのエキソンからなり、99 bpの5' 非翻訳領域との間には2746 bpのイントロンが存在した。このエキソン-イントロンのスプライス部位はGU-AG則に従っていた。よってこのC1Gal-T2は、少なくとも2つのエキソンから構成されていた。アクセッションNo. BC011930でほぼ同等の長さのcDNA配列が登録されていたが、このcDNAの3' 末端にはポリAが付加されている。しかし配列1よりもポリA配列を除いて250 bp短いことから、3' 非翻訳領域に選択的ポリAシグナル付加のmRNAのアイソフォームが存在することが示唆された。クエリーに使用したC1Gal-T1とC1Gal-T2のアミノ酸配列の比較をすると、ホモロジーが30%に満たないにもかかわらず7カ所のシステイン残基がすべて保存されていた。しかし、2価カチオンの結合部位とされるDxD配列は、両遺伝子ともに存在してはいるが位置は異なるものであった(図2)。

【0108】

〔実施例2〕 C1Gal-T2の発現ベクターへの組込み

(a) C1Gal-T2の発現系を作成するため、まずC1Gal-T2のORF全長をインビトロジェン社のGatewayシステムのpDONR201に組込み、さらにインビトロジェン社のpDEST12.2に組み替えた。

【0109】

(b) GatewayシステムによるpDONR201への組込み

(i) エントリークロンの作成

SK-/C2を鋳型としてプライマーF (CB-760: 5'-ggggacaagt ttgtacaaaa aagcag gctt agaaggagat agaaccatgc tttctgaaag cagctcc-3' / 配列番号: 5) とプライマーR (CB-761: 5'-ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaatcattgtcagaaccat-3' / 配列番号: 6) によりPCR (94℃15秒、60℃30秒、68℃1分を15サイクル) により再度DNA断片を得た。目的の断片をゲルから切りだし、精製後BPクローナゼ反応によってpDONR201へ組込み、「エントリークロン」を作成した。反応は目的とするDNA断片5 μ l、pDONR201 1 μ l (150 ng)、反応緩衝液2 μ l、BPクローナ

ーゼ mix 2 μ l を 25℃ で 1 時間 インキュベートして行った。プロテイナーゼ K を 1 μ l 加えて 37℃ 10 分 おき 反応 を 終了 させた。

【0110】

その後上記 mix 全量 (11 μ l) を コンピテントセル (大腸菌 DH5 α) 100 μ l と 混合 し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で 目的 DNA を 確認 し、プラスミド DNA (pDONR-C2) を 抽出・精製した。

【0111】

(ii) 発現クローンの作成

上記エントリークローンは挿入部位の両側にラムダファージが大腸菌から切り出される際の組換部位である attL を持つもので、LR クロナーゼ (ラムダファージの組換酵素 Int、IHF、Xis を 混合 したもの) と デステイネーションベクターと 混合 することで、挿入部位がデステイネーションベクターに移り、発現クローンが作成される。具体的工程は以下のとおりである。

【0112】

まずエントリークローン 1 μ l、pDEST12.2 を 0.5 μ l (75ng)、LR 反応緩衝液 2 μ l、TE 4.5 μ l、LR クロナーゼ mix 2 μ l を 25℃ で 1 時間 反応 させ、プロテイナーゼ K を 1 μ l 加えて 37℃ 10 分 インキュベートして 反応 を 終了 させた (この組換え反応で pDEST12.2-C2 が 生成 される)。pDEST12.2 は、インビトロジェン社で市販されているネオマイシン耐性遺伝子をもつ動物細胞発現用ベクターである。

【0113】

その後上記混合液全量 (11 μ l) を コンピテントセル (大腸菌 DH5 α) 100 μ l と 混合 し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含む LB プレートにまいた。翌日コロニーをとり、直接 PCR で 目的 DNA を 確認 し、ベクター (pDEST12.2-C2) を 抽出・精製した。

【0114】

〔実施例 3〕 大腸癌細胞株 LSC への pDEST12.2-C2 を トランスフェクション

大腸癌細胞株 LSC は、Core1 合成活性 (GalNAc に対しての β 1,3Gal-T 活性) を 持たず、細胞表面のタンパク質上に GalNAc (Tn 抗原; GalNAc-Ser/Thr) を もつ 細胞株で

ある。この細胞株にpDEST12.2-C2をトランスフェクトすることによりC1Gal-T2を強制発現させ、その細胞溶解物を酵素源にして、Core1合成活性を検出した。大腸癌細胞株LSCの培養は、10%ウシ胎児血清-RPMI-1640 培地（インビトロジェン社）（ストレプトマイシン(100 μ g/ml)/ペニシリン(100単位/ml)/L-グルタミン(0.292 mg/ml)) で37°C、5%CO₂存在下で培養した。トランスフェクション前日に1.2x10⁶細胞/2 mlを6穴ディッシュにまいた。このとき、ストレプトマイシンおよびペニシリンを除いた培地に移しかえた。細胞をまいて、次の日にトランスフェクションを実施した。Opti-MEM(インビトロジェン社) 250 μ lに対してLipofectamine2000(インビトロジェン社) 10 μ l加え、室温で5分間インキュベートした。それにOpti-MEM 250 μ lに対してpDEST12.2-C2 10 μ gを混合したものと混ぜ、室温で20分間インキュベートした。合計500 μ lを前日まいた細胞に滴下した。トランスフェクションして2日後、細胞をトリプシン(0.25%)-EDTA(1 mM) (インビトロジェン社)で剥がした。細胞は二分し、ひとつは新しいディッシュにまきなおし、もうひとつは一過性発現での活性測定用にリン酸緩衝液で2回洗浄後、-80°Cに保存した。まきなおした細胞は次の日にジェネティシン(インビトロジェン社)を最終濃度0.6 mg/mlになるように加えた。この安定導入株をLSC-C1Gal-T2と名付けた。

【0115】

〔実施例4〕 C1Gal-T2の受容体基質の探索

C1Gal-T2は、約100種類の既存の糖転移酵素遺伝子と比較して最もCore1 Gal-T1に相同性は高いので、core1 β 1,3-ガラクトース転移酵素類に分類した。そこで、第一に糖供与体基質としてUDP-Galを用いて検討した。

【0116】

以下の反応系を用いて、C2の受容体基質を調べた。下記反応液の「受容体基質」には、pNp- α -GalNAcおよびpNp- β -GalNAc（すべてシグマ社）を用いてそれぞれが受容体として機能するかどうかを調べた。

【0117】

反応液（カッコ内は最終濃度）は受容体基質（10 nmol）、HEPES緩衝液（pH7.4）（14 mM）、MnCl₂（12.5 mM）、UDP-Gal（250 μ M）、UDP-[¹⁴C]-Gal（175 nCi）、

から成り、これに酵素液を $5\mu\text{l}$ 加えて、さらに H_2O を加えて全量 $20\mu\text{l}$ とした。酵素液は、 5×10^6 個の細胞あたり 50 ml の細胞破碎用緩衝液(HEPES緩衝液 (pH 7.4) (20 mM), NaCl (154 mM), TritonX-100 (1%))に懸濁し、水槽式の超音波破碎装置で 4°C 、15分インキュベート後、遠心してその上清を使用した。上記反応混合液を 37°C で2時間反応させ、反応終了後、 H_2O を $200\mu\text{l}$ 加え、軽く遠心後上清を取得した。 10 ml のメタノールで1回洗浄後、 10 ml の H_2O で2回洗浄して平衡化したSep-Pak plus C18 Cartridge(Waters)に該上清を通し、上清中の基質および生成物をカートリッジに吸着させた。 10 ml の H_2O にて2回カートリッジを洗浄後、 5 ml のメタノールで吸着した基質および生成物を溶出した。溶出液を 40°C のヒートブロックにて加熱しながら、窒素ガスを吹き付け蒸発乾固させた。これに、メタノール $20\mu\text{l}$ を添加し、TLCプレート (HPTLC plate Silica gel 60 : MERCK社製) にプロットし、クロロホルム : メタノール : 水 (0.2% CaCl_2 含む) = 55 : 45 : 8の組成からなる展開溶媒を用いて展開した。TLCプレートの上端から 5 mm の所まで展開し、プレートを乾燥後、バイオ・イメージアナライザーFLA3000 (富士写真フイルム社製) を用いて生成物に取り込まれている放射線の量を測定した。

【0118】

その結果、LSC-C1Gal-T2細胞抽出液でpNp- α -GalNAcには強い反応が示され、pNp- β -GalNAcに反応しないことから、C1Gal-T2がガラクトース β 1-3アセチルガラクトサミニル α 1-Rの合成酵素であることが示唆された (図3)。

【0119】

【実施例5】 N-アセチルガラクトサミニル-ペプチド (GalNAc α 1- peptide) を受容体基質とした活性の確認

上記の実験でC1Gal-T2がコア1糖鎖 (ガラクトース β 1-3N-アセチルガラクトサミニル α 1-R) の合成酵素であることが示唆されたため、様々なGalNAc α 1- peptideを受容体基質として再度上記実験を行ったところ、pNp- α -GalNAcに対する場合と同様の反応が示された。

【0120】

GalNAc α 1- peptide受容体基質に対するガラクトース転移酵素活性を調べるために以下の方法で受容体基質を調整した。

【 0 1 2 1 】

ヒトIgA1のヒンジ領域のペプチド配列HP (VPSTPPTPSPSTPPTSPS/配列番号：7) の4、7、9、11、または15番目のSまたはTの-OH基にGalNAcを1つ導入したペプチドおよび4、7、9、11、15番目のSまたはTの-OH基にGalNAを1つずつ導入したペプチドを合成した (ペプチド研究所社)。合成したペプチドは4-GalNAc-HP (VPST (GalNAc) PPTPSPSTPPTSPS)、7-GalNAc-HP (VPSTPPT (GalNAc) PSPSTPPTSPS)、9-GalNAc-HP (VPSTPPTPS (GalNAc) PSTPPTSPS)、11-GalNAc-HP (VPSTPPTPSPS (GalNAc) TPPTSPS)、15-GalNAc-HP (VPSTPPTPSPSTPPT (GalNAc) PSPS)、4、7、9、11、15-GalNAc-HP (VPST (GalNAc) PPT (GalNAc) PS (GalNAc) PS (GalNAc) TPPT (GalNAc) PSPS) と命名した。さらに、受容体基質となる各種GalNAc-HPは、H₂Oに溶かして、ジメチルホルムアミドに溶かしたCy5と1 : 10のモル比となるように混合して、4℃で一晩Cy5標識反応を行った。反応液は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (カラムにはCAPCELL PAK C₁₈ UG120 (資生堂社) を、分離バッファーには0.1%トリフルオロ酢酸を使用し、15から30%のアセトニトリル濃度勾配で溶出した。また、流速は1 ml/minで行い、検出条件は励起波長 : 649 nm、蛍光波長 : 670 nmとした) による精製を行った。Cy5の蛍光を指標に、Cy5標識された各種GalNAc-HP (4-GalNAc-HP-Cy5、7-GalNAc-HP-Cy5、9-GalNAc-HP-Cy5、11-GalNAc-HP-Cy5、15-GalNAc-HP-Cy5、4、7、9、11、15-GalNAc-HP-Cy5) は各々保持時間35.2分、34.4分、35.1分、34.9分、34.6分、31.1分での単一基質ピークとして基質を分取した。分取した基質は凍結乾燥により濃縮した。このように調整した基質は4-GalNAc-HP-Cy5、7-GalNAc-HP-Cy5、9-GalNAc-HP-Cy5、11-GalNAc-HP-Cy5、15-GalNAc-HP-Cy5、4、7、9、11、15-GalNAc-HP-Cy5と命名した。

【 0 1 2 2 】

FITC標識されたヒトの消化器官由来のムチンペプチド配列FITC-MUC1a' (FITC-AHGVTSAPDTR)、同じくFITC標識されたラットの顎下腺ムチンペプチド配列EA2-FITC (PTTDSTTPAPTTK-FITC) を合成した (サワディー・テクノロジー社)。さらに、FITC-MUC1a'、EA2-FITCペプチドを受容体基質として、既知のUDP-N-アセチル-D-ガラクトサミン : ポリペプチドN-アセチルガラクトサミン転移酵素 (GalNA

c-T6またはGalNAc-T10) と反応させた。反応液をHPLC (カラムには5C₁₈-AR Cod e No.378-66 (COSMOSIL社) を、分離バッファーには0.05%トリフルオロ酢酸を使用し、0から50%のアセトニトリル濃度勾配で溶出した。また、流速は1 ml/minで行い、検出条件は励起波長: 492 nm、蛍光波長: 520 nmとした) 分析し、受容体基質FITC-MUC1a' ピーク (保持時間19.6分) と0.8分差を示す単一の産物ピーク (保持時間18.8分)、および、受容体基質EA2-FITCピーク (保持時間20.3分) と0.7分差を示す単一の産物ピーク (保持時間19.6分) を分取し、凍結乾燥後、一部をMALDI-Mass (BRUKER社、機種: REFLEX) で分析し、両産物が受容体基質にGalNAcが1つ転移されたものであることを確認した。このように調整した基質はFITC-MUC1a'-GalNAc、EA2-GalNAc-FITCと命名した。

【 0 1 2 3 】

反応液 (カッコ内は最終濃度) は受容体基質 (5 pmol)、MES緩衝液 (pH 6.5) (100 mM)、MnCl₂ (20 mM)、ATP (2 mM)、UDP-Gal (0.5 mM)、から成り、これにLSC-C1Gal-T2の酵素源を5 μ l加えて、さらにH₂Oを加えて全量20 μ lとした。

【 0 1 2 4 】

上記反応混合液を37°Cで8時間反応させ、反応終了後、H₂Oを60 μ l加え、軽く遠心後上清を取得した。この上清をウルトラフリー-MCカラム (ミリポア社) で精製し、30 μ lを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。カラムにはC APCELL PAK C₁₈ UG120 (資生堂社) を、分離バッファーには0.1%トリフルオロ酢酸を使用し、15から30%のアセトニトリル濃度勾配で溶出した。また、流速は1 ml/minで行った。

【 0 1 2 5 】

前記の細胞破碎用緩衝液で調整したものを酵素源とした場合、GalNAc α 1-peptideを受容体基質のペプチドの分解が起こり、HPLC解析で多数のピークが検出されてしまう。よってGalNAc α 1-peptideを受容体基質として使用する場合、LSC-C1Gal-T2トランスフェクタントからミクロソーム画分を調整し、酵素源として使用した。この場合、ペプチドの分解を抑えられ、目的の生成物がHPLCによって単一ピーク検出が可能であった。

ミクロソーム画分の調整法は、以下に示す。

【0126】

1×10⁸個の細胞株を1 mlの0.25 Mスクロース/10 mM Tris-HCl (pH 7.4)に懸濁し、100 μlのプロテアーゼインヒビターカクテル (シグマ社)を加える。ダウンスのホモジナイザーに細胞懸濁液を移し、200回ストロークして細胞を破碎する。1,000 × gで4℃、10分間遠心して上清を回収する。その上清を10,000 × gで4℃、20分間遠心して上清を回収する。その上清を105,000 × gで4℃、1時間遠心して沈殿をミクロソーム画分として回収し、適当量の0.25 Mスクロース/10 mM Tris-HCl (pH 7.4)に溶解し酵素源として使用した。

【0127】

その結果、11-GalNAc-HP-Cy5を受容体基質、UDP-Galを供与体基質に用いた場合に、その反応産物は28.8分に新たなピークとなって現れた。(図4A,B)

【0128】

〔実施例6〕 ガラクトースとN-アセチルガラクトサミニルα1-Rとの結合様式の解析

ガラクトースとN-アセチルガラクトサミンがどのような結合様式であるかをグリコシダーゼ処理によって確認した。LSC-C1Gal-T2によって11-GalNAc-HP-Cy5にガラクトースが転移された反応産物をβ1,3-ガラクトシダーゼ (明治乳業)で処理して、ガラクトースが転移した11-GalNAc-HP-Cy5のピークがもとの11-GalNAc-HP-Cy5のピークに移ることをHPLCで確認できたので、C1Gal-T2は、GalNAcα1-ペプチドのGalNAcの非還元末端にβ1,3結合でガラクトースが転移するcore1合成酵素であることがin vitroで証明された。(図4C)

【0129】

〔実施例7〕 培養細胞株の細胞表面の糖タンパク質の糖鎖構造の解析

大腸癌細胞株LSCは、Core1 β1-3ガラクトース転移酵素活性が検出されない。よってこの細胞表面には、Tn抗原およびSTn抗原の発現が見られる。この細胞株にC1Gal-T2の安定導入株 (LSC-C1Gal-T2) を作製し、細胞表面上の糖鎖抗原の変化をフローサイトメーターで解析した。LSC-C1Gal-T2の作製法は上記に記述済みである。細胞は、トリプシン(0.25%)-EDTA(1 mM)によってディッシュから剥がし

、0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%アザイド/リン酸緩衝液によって細胞を洗浄した。1×10⁵個の細胞をコア1構造を認識するFITCラベルされたPeanut agglutininレクチン(PNA-FITC; EY Laboratories, Inc.)、HB STn1(抗シアリルTn抗原モノクローナル抗体、マウスIgM; DAKO)、HB-T1(抗Tn抗原モノクローナル抗体、マウスIgG1; DAKO)で染色した。PNA-FITCは、50 μg/ml、HB STn1およびHB-T1は、100倍希釈して細胞と4℃で30分間反応させた。0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%アザイド/リン酸緩衝液によって2回細胞を洗浄後、HB STn1およびHB-T1で染色した細胞に対して、FITCラベルの二次抗体(抗マウスIgG抗体、抗マウスIgM抗体は共に1,000倍希釈)と4℃で30分間反応させた。0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%アザイド/リン酸緩衝液によって2回細胞を洗浄後、0.5%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝液で固定し、FACSCaliber(ベクトンディッキンソン社)にてFITCの強度を測定した。LSC-C1Gal-T2は、LSC細胞と比べPNAで染色性が増加し、TnおよびシアリルTn抗原の染色性の低下が見られた(図5)。LSC細胞表面上のTn抗原はC1Gal-T2の作用によってガラクトースが転移されT抗原になり、シアリルTn抗原もC1Gal-T2が内因性のシアル酸転移酵素との競合作用に打ち勝つことにより減少し、T抗原が発現したと考えられた。この結果からC1Gal-T2は、細胞内においてもCore1合成酵素であることが証明された。

【 0 1 3 0 】

〔実施例8〕 ヒト種々組織及び株化細胞での発現

ヒト正常組織及び株化細胞のcDNAを用いて、定量的PCRにより該遺伝子の発現量を定量した。正常組織のcDNAとしてはクロンテック社のMarathon Ready cDNAを使用し、株化細胞に関しては総RNAを抽出し、常法によりcDNAを作製し使用した。C1Gal-T2の定量的発現解析に使用したプライマーはC2-RT-FP1(5'-gtttgcctga aatatgctgg agtat-3' / 配列番号: 8)、C2-RT-RP3(5'-caacagcctt ctactacctg gttg -3' / 配列番号: 9)、プローブはC2-RT-MGB1(5'-cagaaaatgc agaagatgct gatggaaaag atgta-3' / 配列番号: 10)である。なお、C2-RT-MGB1プローブにはアプライドバイオシステムズ社のマイナーグループバインダーを結合したものを使用した。酵素及び反応液にはUniversal PCR Master Mixを使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System(ともにアプライドバイオシステムズ社)

により反応液量25 μ lで定量を行った。定量の標準遺伝子としてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子を使用し、既知濃度の鋳型DNAにより定量の検量線を作成し該遺伝子の発現量の標準化を行った。反応温度は50℃2分、95℃10分のあと、95℃15秒・60℃1分を50サイクル行った。結果を図6に示した。

【0131】

【実施例9】 C1Gal-T2変異体の解析

ヒト細胞株であるLSCおよびJurkat細胞は、コア1合成活性を持たないことが知られている。この2つの細胞株のC1Gal-T1およびC1Gal-T2の遺伝子発現をリアルタイムPCRで定量したところ、コア1合成活性を持つ細胞株LSBおよびK562細胞と同レベルの発現を確認した(図8)。

【0132】

これらの4つの細胞株のゲノムDNAおよびcDNAから、PCRによってC1Gal-T1およびC1Gal-T2遺伝子を増幅し、直接シーケンス法によって核酸配列を決定した。C1Gal-T1のcDNAからの増幅プライマーには、5'-AGAAATACACTTTCGGGAA-3' (配列番号: 11) と5'-TGCAGTGCTAGACATATTAC-3' (配列番号: 12) を使用し、C1Gal-T2のcDNAからの増幅プライマーには、5'-GCTTTCCTGTCCCAAGCCGTTTC-3' (配列番号: 13) と5'-GCCCCACAGATTCTAATGTTC-3' (配列番号: 14) を使用した。また、C1Gal-T2のゲノムDNAからの増幅プライマーには、5'-GTAATCAGATTCCATTGGAAGC-3' (配列番号: 15) と5'-GCCCCACAGATTCTAATGTTC-3' (配列番号: 14) を使用した。

【0133】

C1Gal-T1の配列は、4つの細胞株のcDNAおよびゲノムDNAですべて登録された配列と同一であった。コア1合成活性を持つLSBおよびK562細胞のC1Gal-T2の配列は、cDNAおよびゲノムDNA共にコア1合成活性の確認された配列と同一であった(図9A)。LSC細胞のC1Gal-T2の配列は、開始コドンのATGのAを1とした時の53番目のTと54番目のCの間にTが1つ挿入されていた(図9B)。このことによりフレームシフトが生じ、途中終止コドンが出現した。Jurkat細胞のC1Gal-T2の配列は、428番目のCがTに変わり、アミノ酸がアラニンからバリンに変わるミスセン

ス変異と468番目のTが欠失していた（図9C）。この場合もフレームシフトが生じ、途中終止コドンが出現した。

【0134】

C1GalT-2遺伝子は、X染色体上にあり、男性の場合はこの遺伝子をもつアリルは1本であり、女性の場合は、2本である。Jurkat細胞は、男性由来の細胞株であり、1本のX染色体上の不活性型のC1Gal-T2が存在することになる。LSCの場合、どちらかわからないが、cDNAおよびゲノムでC1Gal-T2配列に変異のあるものしか見つからなかった。

【0135】

以上よりLSCおよびJurkat細胞ではC1Gal-T2が不活性型のためコア1合成活性を示さないことが判明した。また、C1Gal-T1が、mRNAの発現があるのに酵素活性を検出することができなかったことにより、C1Gal-T2がより比活性が強いコア1合成酵素であることが示唆された。

【0136】

〔実施例10〕 新規ガラクトース転移酵素C1Gal-T3の同定

本発明者らによって同定されたC1Gal-T2 (AB084170)をクエリーにして、公共のデータベースを検索したところ、相同性をもつ配列が登録されていた。この遺伝子は、ヒトではゲノム配列情報でしか存在しておらず(AC011242, AC084264 (第2染色体))、ORFは一つのエキソンからなると予想され、C1Gal-T2とアミノ酸レベルで68%の相同性を持ち、システイン残基は、7か所中6か所で保存されていた（図10）。この配列によってコードされる新規ガラクトース転移酵素を、本発明者らはC1Gal-T3と名付けた。また、この遺伝子と96%相同性をもつクローンが *Macaca fascicularis* の精巢のcDNAクローン (AB071109)として登録されていた。

【0137】

〔実施例11〕 C1Gal-T3の発現ベクターへの組込み

(a) C1Gal-T3の発現系を作成するため、まずC1Gal-T3のORF全長をインビトロジェン社のGatewayシステムのpDONR201に組込み、さらにインビトロジェン社のpDEST12.2に組み換えた。

【0138】

(b) 次のようにして、GatewayシステムによるpDONR201への組込みを行った。

(i) エントリークローンの作成

Uterusより得られたcDNA (クロンテック社、Marathon-ready cDNA) を鋳型としプライマーF (C5GFSKD1: 5'- ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgg tttccgctag tgggacatc -3' / 配列番号: 16) とプライマーR (C5GR: 5'- ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagtcattt tctgaaccaa ctggag -3' / 配列番号: 17) を用いてPCR (98℃10秒、55℃30秒、72℃1分30秒を30サイクル) を行いDNA断片を得た。目的の断片をゲルから切り出し、精製後BPクローナーゼ反応によってpDONR201へ組込み、「エントリークローン」を作成した。反応は目的とするDNA断片2 μ l、pDONR201 1 μ l (150 ng)、BP反応緩衝液2 μ l、BPクローナーゼmix 2 μ lを25℃で1時間インキュベーションして行った。プロテイナーゼKを1 μ l加えて37℃、10分間おき反応を終了させた。その反応混合液1 μ lをコンピテントセル (大腸菌DH5 α) 50 μ lと混合し、ヒートショック法の後、カナマイシンを含むLBプレートに播いた。翌日コロニーをとり、直接PCRで目的DNAを確認し、プラスミドDNA (pDONR-C1GalT-3) を抽出、精製した。理論上のORF 948 bp (配列番号: 18) が得られ、このORFから315アミノ酸が推定された (配列番号: 19)。アミノ酸配列によりほとんどの糖転移酵素に見られる典型的な2型の膜タンパク質であることが予想された。

【0139】

(ii) 発現クローンの作成

まずエントリークローン1 μ l、pDEST12.2を1 μ l (150 ng)、LR反応緩衝液2 μ l、TE 4 μ l、LRクローナーゼmix 2 μ lを25℃で1時間反応させ、プロテイナーゼKを1 μ l加えて10分間、37℃でインキュベーションし反応を終了させた。pDEST12.2はインビトロジェン社から市販されているネオマイシン耐性遺伝子をもつ動物細胞発現用ベクターである。

【0140】

その後上述反応混合液1 μ lをコンピテントセル (大腸菌DH5 α) 50 μ lと混合し、ヒートショック法の後、アンピシリンを含むLBプレートに播いた。翌日コロニ

ーをとり、直接PCRで目的DNAを確認し、ベクター (pDEST12.2-C1Gal-T3) を抽出、精製した。

【 0 1 4 1 】

〔実施例 1 2〕 C1Gal-T3のFLAGタグつき融合タンパク発現ベクターへの組み込み
pDONR-C1Gal-T3のDNAを鋳型にしてプライマーF (TKC-7: 5' - gcccaagctt caca gaggtc aaactcaaga ccac -3' (配列番号: 2 0) / 下線部はHindIIIの切断配列) とプライマーR (TKC-9: 5' - cggaattctc agtcattttc tgaaccaact g -3' (配列番号: 2 1) / 下線部はEcoRIの切断配列) を用いてPCR (98℃10秒、55℃30秒、72℃1分30秒を18サイクル) を行いDNA断片を得た。制限酵素処理 (HindIII-EcoRI) 後、目的の断片をゲルから切り出し、精製後DNAリガーゼ反応によってpFLAG-CMV-3ベクター (シグマ社) へ組み込み、pFLAG-C1Gal-T3と名付けた。pFLAG-CMV-3ベクターは、5' からプレプロトリプシンの分泌シグナル、タグとしてFLAG配列を持っており、その3' 側に目的の遺伝子を挿入することによりリコンビナントタンパク質を作製することができる。糖転移酵素遺伝子の場合、アミノ末端に存在する膜貫通領域を除いたカルボキシル末端側 (酵素活性領域) を組み換えることによりその酵素の活性を持つものを得ることができるが知られている。

【 0 1 4 2 】

〔実施例 1 3〕 COS-1細胞へのpFLAG-C1Gal-T3の一過性トランスフェクション
pFLAG-C1Gal-T3のプラスミドDNAをCONCERT High Purity Plasmid Maxiprep System (インビトロジェン社) により大量に精製した。COS-1細胞の培養は、10%ウシ胎児血清-DMEM 培地 (インビトロジェン社) (ストレプトマイシン (100 μ g/ml) / ペニシリン (100単位/ml) /) で37℃、5%CO₂存在下で培養した。トランスフェクション前日に3 \times 10⁶細胞/12 mlを9cmディッシュにまいた。このとき、ストレプトマイシンおよびペニシリンを除いた培地に移しかえた。細胞をまいて、次の日にトランスフェクションを実施した。Opti-MEM (インビトロジェン社) 1.5mlに対してLipofectamine2000 (インビトロジェン社) 60 μ l 加え、室温で5分間インキュベートした。それにOpti-MEM 1.5mlに対してpFLAG-C1Gal-T3 30 μ gを混合したものと混ぜ、室温で20分間インキュベートした。合計3mlを前日まいた細胞に滴下した。トランスフェクションして2日後、培養上清を回収し使用するまで-80℃に

保存した。

【0143】

〔実施例14〕 培養上清からのリコンビナント酵素の精製とその確認

10mlの培養上清に対して、100 μ lの抗FLAG M1モノクローン抗体-アガロースアフィニティーゲル、2 mM CaCl_2 、150 mM NaCl 、0.05% NaN_3 になるように加え、回転板でレジンが混ざるように回転させながら4℃で一晩吸着させた。1mM CaCl_2 / TBS緩衝液(50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl)で2回洗浄後、50 μ lの抽出バッファー(2mM EDTA/TBS緩衝液)を加えた。その一部をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動を行い、そのタンパク質をHybond-Pナイロンメンブレンに転写させた後、抗FLAG M1モノクローン抗体(シグマ社)によりウエスタン解析を行った。コニカイムノステインHRP1000(コニカ社)により発色を行い、C1Gal-T3のリコンビナント酵素は、約40 kDaの位置に検出できた。

【0144】

〔実施例15〕 C1Gal-T3のN-アセチルガラクトサミニルペプチド(GalNAc α 1-peptide)を受容体基質とした活性の確認

COS-1細胞で発現させたC1Gal-T3のリコンビナント酵素を酵素源として、実施例5と同様にN-アセチルガラクトサミニルペプチドを受容体基質として、ガラクトース転移酵素活性を測定した。その結果、4-GalNAc-HPに対してのガラクトース転移酵素活性が確認できた。

【0145】

〔実施例16〕 ヒト種々組織でのC1Gal-T3転写産物の発現

ヒト正常組織のcDNAを用いて、定量的PCRにより該遺伝子の発現量を定量した。正常組織のcDNAとしてはクロンテック社の総RNAから、常法によりcDNAを作製し使用した。C1Gal-T3の定量的発現解析に使用したプライマーはC5-RT-FP1(5'-gcctgaaata tgcaggagtt ca -3' (配列番号: 22))、C5-RT-RP2(5'-ggttattaga caatgcctct tcaataag -3' (配列番号: 23))、プローブはC5-RT-MGB1(5'-FAM-gcagaaaatg cagaggatta tgaaggaaga gatgta-MGB-TAMRA-3' (配列番号: 24))である。なお、C5-RT-MGB1プローブにはアプライドバイオシステムズ社のマイナーグループバインダーを結合したものを使用した。酵素及び反応液にはUn

iversal PCR Master Mixを使用し、ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (ともにアプライドバイオシステムズ社) により反応液量25 μ lで定量を行った。定量の標準遺伝子としてはグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) 遺伝子を使用し、既知濃度の鋳型DNAにより定量の検量線を作成し該遺伝子の発現量の標準化を行った。反応温度は50℃2分、95℃10分のあと、95℃15秒・60℃1分を50サイクル行った。結果を図11に示した。

【0146】

【発明の効果】

本発明により、新規ガラクトース転移酵素をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ベクターを含む宿主細胞、該ポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチド、該ポリペプチドの製造方法が提供された。さらに、該ポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物の同定方法が提供された。本発明のポリペプチドやポリヌクレオチド、または本発明のポリペプチドのガラクトース転移酵素活性を変化させる化合物は、本発明のポリペプチドが関連する疾患の新しい予防薬や治療薬の開発への利用が期待される。さらに本発明によって、本発明のポリペプチドをコードする遺伝子の変異や発現を検出することを含む疾患の検査方法が提供された。ガラクトース転移酵素は医薬品開発や医療の分野において最も重要かつ注目されている分子の一つであり、本発明において新規ガラクトース転移酵素が提供されたことにより、これら分野の発展が期待される。ガラクトース転移酵素の研究者にとっても、本発明は貴重な情報源となり得るものと期待される。

【0147】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> National Institute of Advanced Industrial Science and Technology

<120> Novel galactosyltransferase, the polypeptide of the enzyme,
and the nucleic acid encoding the enzyme

<130> 236-02237

<140>

<141>

<150> JP 2002-94772

<151> 2002-03-29

<160> 24

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1471

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (105)..(1058)

<400> 1

agaacagcct ggtcaggagc gtaacggagt ggtgcgcaa cgtgagagga aacccgtgcg 60

cggctgcgct ttcctgtccc caagccgttc tagacgcggg aaaa atg ctt tct gaa 116

Met Leu Ser Glu

1

agc agc tcc ttt ttg aag ggt gtg atg ctt gga agc att ttc tgt gct 164

Ser Ser Ser Phe Leu Lys Gly Val Met Leu Gly Ser Ile Phe Cys Ala

5 10 15 20

ttg atc act atg cta gga cac att agg att ggt cat gga aat aga atg 212

Leu Ile Thr Met Leu Gly His Ile Arg Ile Gly His Gly Asn Arg Met

25 30 35

cac cac cat gag cat cat cac cta caa gct cct aac aaa gaa gat atc 260

His His His Glu His His His Leu Gln Ala Pro Asn Lys Glu Asp Ile

40 45 50

ttg aaa att tca gag gat gag cgc atg gag ctc agt aag agc ttt cga 308

Leu Lys Ile Ser Glu Asp Glu Arg Met Glu Leu Ser Lys Ser Phe Arg

55 60 65

gta tac tgt att atc ctt gta aaa ccc aaa gat gtg agt ctt tgg gct 356

Val Tyr Cys Ile Ile Leu Val Lys Pro Lys Asp Val Ser Leu Trp Ala

70 75 80

gca gta aag gag act tgg acc aaa cac tgt gac aaa gca gag ttc ttc 404

Ala Val Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp Lys Ala Glu Phe Phe

85 90 95 100

agt tct gaa aat gtt aaa gtg ttt gag tca att aat atg gac aca aat 452

Ser Ser Glu Asn Val Lys Val Phe Glu Ser Ile Asn Met Asp Thr Asn

105 110 115

gac atg tgg tta atg atg aga aaa gct tac aaa tac gcc ttt gat aag 500

Asp Met Trp Leu Met Met Arg Lys Ala Tyr Lys Tyr Ala Phe Asp Lys
120 125 130

tat aga gac caa tac aac tgg ttc ttc ctt gca cgc ccc act acg ttt 548
Tyr Arg Asp Gln Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Arg Pro Thr Thr Phe
135 140 145

gct atc att gaa aac cta aag tat ttt ttg tta aaa aag gat cca tca 596
Ala Ile Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Phe Leu Leu Lys Lys Asp Pro Ser
150 155 160

cag cct ttc tat cta ggc cac act ata aaa tct gga gac ctt gaa tat 644
Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Ile Lys Ser Gly Asp Leu Glu Tyr
165 170 175 180

gtg ggt atg gaa gga gga att gtc tta agt gta gaa tca atg aaa aga 692
Val Gly Met Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Val Glu Ser Met Lys Arg
185 190 195

ctt aac agc ctt ctc aat atc cca gaa aag tgt cct gaa cag gga ggg 740
Leu Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Glu Lys Cys Pro Glu Gln Gly Gly
200 205 210

atg att tgg aag ata tct gaa gat aaa cag cta gca gtt tgc ctg aaa 788
Met Ile Trp Lys Ile Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala Val Cys Leu Lys
215 220 225

tat gct gga gta ttt gca gaa aat gca gaa gat gct gat gga aaa gat 836
Tyr Ala Gly Val Phe Ala Glu Asn Ala Glu Asp Ala Asp Gly Lys Asp

230

235

240

gta ttt aat acc aaa tct gtt ggg ctt tct att aaa gag gca atg act 884

Val Phe Asn Thr Lys Ser Val Gly Leu Ser Ile Lys Glu Ala Met Thr

245

250

255

260

tat cac ccc aac cag gta gta gaa ggc tgt tgt tca gat atg gct gtt 932

Tyr His Pro Asn Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser Asp Met Ala Val

265

270

275

act ttt aat gga ctg act cca aat cag atg cat gtg atg atg tat ggg 980

Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Asn Gln Met His Val Met Met Tyr Gly

280

285

290

gta tac cgc ctt agg gca ttt ggg cat att ttc aat gat gca ttg gtt 1028

Val Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Ile Phe Asn Asp Ala Leu Val

295

300

305

ttc tta cct cca aat ggt tct gac aat gac tgagaagtgg tagaaaagcg 1078

Phe Leu Pro Pro Asn Gly Ser Asp Asn Asp

310

315

tgaatatgat cttgtatag gacgtgtgtt gtcattattt gtagtagtaa ctacatatcc 1138

aatacagctg tatgtttctt tttcttttct aatttggtgg cactggtata accacacatt 1198

aaagtcagta gtacattttt aaatgagggt gggttttttc tttaaaacac atgaacattg 1258

taaagtgtgtt ggaaagaagt gttttaagaa taataatttt gcaaataaac tattaataaa 1318

tattatatgt gataaattct aaattatgaa cattagaaat ctgtggggca catatTTTTg 1378

ctgattgggt aaaaaatttt aacaggtctt tagcgttcta agatatgcaa atgatatctc 1438

tagttgtgaa tttgtgatta aagtaaaact ttt 1471

<210> 2

<211> 318

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Ser Glu Ser Ser Ser Phe Leu Lys Gly Val Met Leu Gly Ser

1 5 10 15

Ile Phe Cys Ala Leu Ile Thr Met Leu Gly His Ile Arg Ile Gly His

20 25 30

Gly Asn Arg Met His His His Glu His His His Leu Gln Ala Pro Asn

35 40 45

Lys Glu Asp Ile Leu Lys Ile Ser Glu Asp Glu Arg Met Glu Leu Ser

50 55 60

Lys Ser Phe Arg Val Tyr Cys Ile Ile Leu Val Lys Pro Lys Asp Val

65 70 75 80

Ser Leu Trp Ala Ala Val Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp Lys

85

90

95

Ala Glu Phe Phe Ser Ser Glu Asn Val Lys Val Phe Glu Ser Ile Asn

100

105

110

Met Asp Thr Asn Asp Met Trp Leu Met Met Arg Lys Ala Tyr Lys Tyr

115

120

125

Ala Phe Asp Lys Tyr Arg Asp Gln Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Arg

130

135

140

Pro Thr Thr Phe Ala Ile Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Phe Leu Leu Lys

145

150

155

160

Lys Asp Pro Ser Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Ile Lys Ser Gly

165

170

175

Asp Leu Glu Tyr Val Gly Met Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Val Glu

180

185

190

Ser Met Lys Arg Leu Asn Ser Leu Leu Asn Ile Pro Glu Lys Cys Pro

195

200

205

Glu Gln Gly Gly Met Ile Trp Lys Ile Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala

210

215

220

Val Cys Leu Lys Tyr Ala Gly Val Phe Ala Glu Asn Ala Glu Asp Ala

225

230

235

240

Asp Gly Lys Asp Val Phe Asn Thr Lys Ser Val Gly Leu Ser Ile Lys

245

250

255

Glu Ala Met Thr Tyr His Pro Asn Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser

260

265

270

Asp Met Ala Val Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Asn Gln Met His Val

275

280

285

Met Met Tyr Gly Val Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Ile Phe Asn

290

295

300

Asp Ala Leu Val Phe Leu Pro Pro Asn Gly Ser Asp Asn Asp

305

310

315

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gaagatctag aatgcaccac catgagcatc

30

<210> 4

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

ataagaatgc ggccgctcag tcattgtcag aaccatttg

39

<210> 5

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt agaaggagat agaaccatgc tttctgaaag 60

cagctcc

67

<210> 6

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcaatcattg tcagaaccat 50

<210> 7

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Peptide Sequence

<400> 7

Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro

1

5

10

15

Ser Pro Ser

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gtttgcctga aatatgctgg agtat

25

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

caacagcctt ctactacctg gttg

24

<210> 10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<400> 10

cagaaaatgc agaagatgct gatggaaaag atgta

35

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

agaaatacac ttctgggaa

19

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

tgccagtgccta gacatattac

20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gcttttcctgt ccccaagccg ttc

23

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gccccacaga tttctaattgt tc

22

<210> 15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 15

gtaatcagat tccattggaa gc

22

<210> 16

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt cgaaggagat agaaccatgg tttccgctag 60

tgggacatc

69

<210> 17

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 17

ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc tcagtcattt tctgaaccaa ctggag 56

<210> 18

<211> 948

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(948)

<400> 18

atg gtt tcc gct agt ggg aca tca ttt ttt aag ggt atg ttg ctt ggg 48

Met Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Phe Phe Lys Gly Met Leu Leu Gly

1

5

10

15

agc att tcc tgg gtt ttg ata act atg ttt ggc caa att cac att cga 96

Ser Ile Ser Trp Val Leu Ile Thr Met Phe Gly Gln Ile His Ile Arg

20

25

30

cac aga ggt caa act caa gac cac gag cac cat cac ctt cgt cca cct 144

His Arg Gly Gln Thr Gln Asp His Glu His His His Leu Arg Pro Pro

35

40

45

aac agg aac gat ttc tta aac act tca aaa gtg ata ctc ttg gag ctc 192

Asn Arg Asn Asp Phe Leu Asn Thr Ser Lys Val Ile Leu Leu Glu Leu

50

55

60

agt aaa agt att cgt gtt ttc tgt atc atc ttt gga gaa tcc gaa gat 240

Ser Lys Ser Ile Arg Val Phe Cys Ile Ile Phe Gly Glu Ser Glu Asp

65

70

75

80

gag agt tac tgg gct gta ctg aaa gag acc tgg acc aaa cac tgt gac 288

Glu Ser Tyr Trp Ala Val Leu Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp

85

90

95

aaa gca gag ctc tac gat act aaa aat gat aat ttg ttc aat ata gaa 336

Lys Ala Glu Leu Tyr Asp Thr Lys Asn Asp Asn Leu Phe Asn Ile Glu

100

105

110

agt aat gac agg tgg gta cag atg agg acc gct tac aaa tac gtc ttt 384

Ser Asn Asp Arg Trp Val Gln Met Arg Thr Ala Tyr Lys Tyr Val Phe

115

120

125

gaa aag tat ggt gac aac tac aac tgg ttc ttc ctt gca ctt ccc act 432

Glu Lys Tyr Gly Asp Asn Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Leu Pro Thr

130

135

140

acg ttt gct gtc att gaa aat tta aag tac ctt ttg ttt aca agg gat 480

Thr Phe Ala Val Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Leu Leu Phe Thr Arg Asp

145

150

155

160

gca tcc cag ccc ttc tat ctg ggc cac act gtt ata ttt gga gac ctc 528

Ala Ser Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Val Ile Phe Gly Asp Leu

165

170

175

gaa tac gtg act gtg gaa gga ggg att gtc tta agc aga gag ttg atg 576

Glu Tyr Val Thr Val Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Met

180

185

190

aaa aga ctt aac aga ctt ctc gat aac tct gag acc tgt gca gat caa 624

Lys Arg Leu Asn Arg Leu Leu Asp Asn Ser Glu Thr Cys Ala Asp Gln

195

200

205

agt gtg att tgg aag tta tct gaa gat aag cag ctg gca ata tgc ctg 672

Ser Val Ile Trp Lys Leu Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala Ile Cys Leu

210

215

220

aaa tat gca gga gtt cat gca gaa aat gca gag gat tat gaa gga aga 720

Lys Tyr Ala Gly Val His Ala Glu Asn Ala Glu Asp Tyr Glu Gly Arg

225

230

235

240

gat gta ttt aat aca aaa cca atc gca cag ctt att gaa gag gca ttg 768

Asp Val Phe Asn Thr Lys Pro Ile Ala Gln Leu Ile Glu Glu Ala Leu
245 250 255

tct aat aac cct cag caa gta gta gaa ggc tgc tgt tca gat atg gct 816
Ser Asn Asn Pro Gln Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser Asp Met Ala
260 265 270

att act ttc aat gga ctg acc ccc caa aag atg gaa gta atg atg tat 864
Ile Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Gln Lys Met Glu Val Met Met Tyr
275 280 285

ggc ctg tac cgg ctc agg gca ttt gga cac tat ttc aat gac aca ctc 912
Gly Leu Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Tyr Phe Asn Asp Thr Leu
290 295 300

gtt ttc ttg cct cca gtt ggt tca gaa aat gac tga 948
Val Phe Leu Pro Pro Val Gly Ser Glu Asn Asp
305 310 315

<210> 19

<211> 315

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met Val Ser Ala Ser Gly Thr Ser Phe Phe Lys Gly Met Leu Leu Gly
1 5 10 15
Ser Ile Ser Trp Val Leu Ile Thr Met Phe Gly Gln Ile His Ile Arg

20	25	30
His Arg Gly Gln Thr Gln Asp	His Glu His His His Leu Arg Pro Pro	
35	40	45
Asn Arg Asn Asp Phe Leu Asn Thr Ser Lys Val Ile Leu Leu Glu Leu		
50	55	60
Ser Lys Ser Ile Arg Val Phe Cys Ile Ile Phe Gly Glu Ser Glu Asp		
65	70	75
Glu Ser Tyr Trp Ala Val Leu Lys Glu Thr Trp Thr Lys His Cys Asp		
85	90	95
Lys Ala Glu Leu Tyr Asp Thr Lys Asn Asp Asn Leu Phe Asn Ile Glu		
100	105	110
Ser Asn Asp Arg Trp Val Gln Met Arg Thr Ala Tyr Lys Tyr Val Phe		
115	120	125
Glu Lys Tyr Gly Asp Asn Tyr Asn Trp Phe Phe Leu Ala Leu Pro Thr		
130	135	140
Thr Phe Ala Val Ile Glu Asn Leu Lys Tyr Leu Leu Phe Thr Arg Asp		
145	150	155
Ala Ser Gln Pro Phe Tyr Leu Gly His Thr Val Ile Phe Gly Asp Leu		
165	170	175
Glu Tyr Val Thr Val Glu Gly Gly Ile Val Leu Ser Arg Glu Leu Met		
180	185	190
Lys Arg Leu Asn Arg Leu Leu Asp Asn Ser Glu Thr Cys Ala Asp Gln		
195	200	205
Ser Val Ile Trp Lys Leu Ser Glu Asp Lys Gln Leu Ala Ile Cys Leu		
210	215	220
Lys Tyr Ala Gly Val His Ala Glu Asn Ala Glu Asp Tyr Glu Gly Arg		
225	230	235
Asp Val Phe Asn Thr Lys Pro Ile Ala Gln Leu Ile Glu Glu Ala Leu		
245	250	255

Ser Asn Asn Pro Gln Gln Val Val Glu Gly Cys Cys Ser Asp Met Ala

260

265

270

Ile Thr Phe Asn Gly Leu Thr Pro Gln Lys Met Glu Val Met Met Tyr

275

280

285

Gly Leu Tyr Arg Leu Arg Ala Phe Gly His Tyr Phe Asn Asp Thr Leu

290

295

300

Val Phe Leu Pro Pro Val Gly Ser Glu Asn Asp

305

310

315

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially

Synthesized Primer Sequence

<400> 20

gcccaagctt cacagaggtc aaactcaaga ccac

34

<210> 21

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 21

cggaattctc agtcattttc tgaaccaact g

31

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 22

gcctgaaata tgcaggagtt ca

22

<210> 23

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 23

ggttattaga caatgcctct tcaataag

28

<210> 24

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM

<220>

<221> misc_binding

<222> (36)

<223> Label MGB-TAMRA

<400> 24

gcagaaaatg cagaggatta tgaaggaaga gatgta

36

【図面の簡単な説明】

【図 1】 C1Gal-T2 cDNAの塩基配列、および該配列によってコードされる

アミノ酸配列を示す図である。推定膜貫通ドメインを四角で囲み、ポリアデニル化シグナルは下線で示した。アスパラギンにリンクしたグリコシル化サイトを二重下線で示し、矢印はスプライシングサイトを示す。

【図 2】 C1Gal-T2とC1Gal-T1のアミノ酸配列の比較を示す図である。保存されたシステイン残基を四角で囲んだ。

【図 3】 TLCプレートをイメージアナライザーFLA3000で測定した結果を示す写真である。

【図 4】 11-GalNAc-HPから由来する反応産物のHPLC解析の結果を示す図である。Cy5-ラベル化11-GalNAc-HPの溶出位置は、ピークSとして示した（パネルA）。パネルBは、LSC-C1Gal-T2細胞ライセートおよび残りの基質（ピークS）のミクロソーム画分の反応生成物（ピークP）を示す。 β 1,3-ガラクトシダーゼによる消化後の反応生成物（ピークP）をパネルCに示す。

【図 5】 ヒトC1Gal-T2でトランスフェクトしたLSC細胞のフローサイトメトリー解析の結果を示す図である。LSC-hC1Gal-T2トランスフェクタントの表面のT関連抗原の発現をフローサイトメトリーによって解析した。各パネルの薄い線は、各種レクチンまたは抗体により染色したLSC細胞でmockトランスフェクトした結果を示す。各パネルは、(A)PNAレクチン、(B)HBSTn1(STn)、および(C)HB-T1(Tn)で染色したLSC細胞のステーブルトランスフェクタントを示す。

【図 6】 リアルタイムPCRによる種々のヒト細胞におけるヒトC1Gal-T2転写物の定量解析の結果を示す図である。C1Gal-T2およびGAPDHの標準曲線は、各プラスミドの希釈系列によって作成した。C1Gal-T2転写物の発現レベルは、GAPDH転写物の発現レベルで標準化した。

【図 7】 糖転移酵素の8種類のコア構造を示す図である。

【図 8】 各種細胞株およびLSC-C1Gal-T2におけるGalNAc- α -pNpに対するコア1合成活性(A)とC1Gal-T1とC1Gal-T2の転写発現量(B)を示す写真および図である。

【図 9】 AはC1GalT1-2配列と、K562、LSB、LSC、Jurkatの各配列との比較を模式的に示す図である。BはLSBとLSC、CはLSBとJurkatとの比較を示す図である。

【図 1 0】 C1Gal-T3とC1Gal-T2のアミノ酸配列の比較を示す図である。

【図 1 1】 定量的PCRによる種々のヒト組織におけるヒトC1Gal-T3転写物の定量発現解析の結果を示す図である。定量の標準遺伝子としてはGAPDH遺伝子を使用し、既知濃度の鋳型DNAにより定量の検量線を作成し該遺伝子の発現量の標準化を行った。

【書類名】 図面

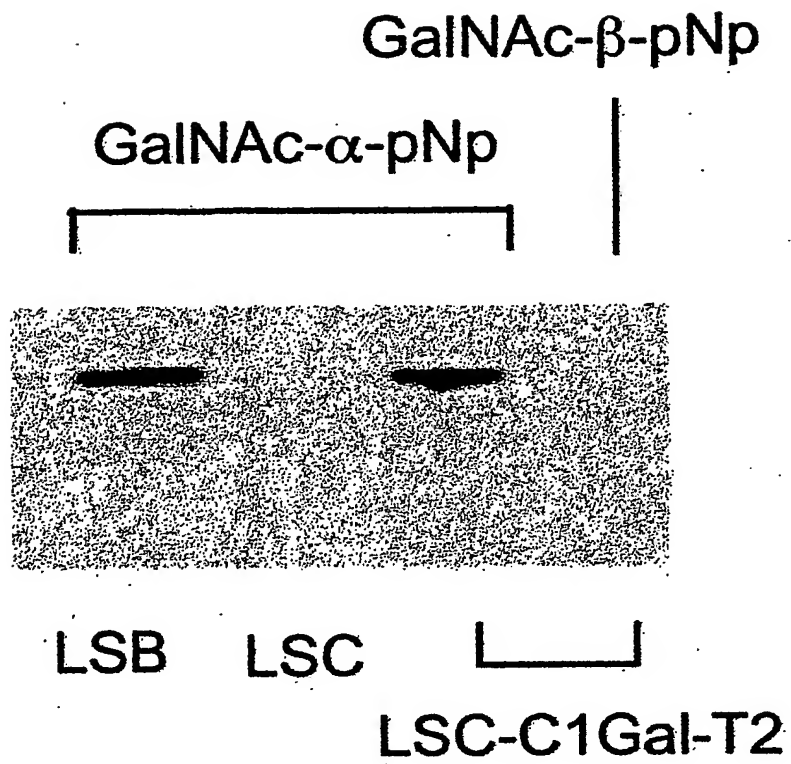
【図1】

	AGAACAGCCTGGTCAGGAGCGTAACGGAGTGGTGCGCCAACGTG	-61
-60	AGAGGAAACCCGTGCGCGGCTGCGCTTTCTGTCCCAAGCCGTTCTAGACGCGGGA	-1
1	ATGCTTTCTGAAAGCAGCTCCTTTTTGAAGGGTGTGATGCTTGGAAAGCATTCTGTGCT	60
	M L S E S S S F L K G V M L G S I F C A	
61	TTGATCACTATGCTAGGACACATTAGGATTGGTCATGGAAATAGAATGCACCACCATGAG	120
	L I T M L G H I R I G H G N R M H H H E	
121	CATCATCACCTACAAGCTCCTAACAAAGAAGATATCTTGAAAATTCAGAGGATGAGCGC	180
	H H H L Q A P N K E D I L K I S E D E R	
181	ATGGAGCTCAGTAAGAGCTTTCGAGTATACTGTATTATCCTTGTAACCCAAAGATGTG	240
	M E L S K S F R V Y C I I L V K P K D V	
241	AGTCTTTGGGCTGCAGTAAAGGAGACTTGGACCAAACACTGTGACAAAGCAGAGTTCTTC	300
	S L W A A V K E T W T K H C D K A E F F	
301	AGTTCTGAAAATGTTAAAGTGTGAGTCAATTAATATGGACACAAATGACATGTGGTTA	360
	S S E N V K V F E S I N M D T N D M W L	
361	ATGATGAGAAAAGCTTACAAATACGCCCTTTGATAAGTATAGAGACCAATACAACCTGGTTC	420
	M M R K A Y K Y A F D K Y R D Q Y N W F	
421	TTCTTGCACGCCCCACTACGTTTGCTATCATTTGAAAACCTAAAGTATTTTTGTAAAA	480
	F L A R P T T F A I I E N L K Y F L L K	
481	AAGGATCCATCACAGCCTTTCTATCTAGGCCACACTATAAAATCTGGAGACCTTGAATAT	540
	K D P S Q P F Y L G H T I K S G D L E Y	
541	GTGGGTATGGAAGGAGGAATTGTCTTAAGTGTAGAATCAATGAAAAGACTTAACAGCCTT	600
	V G M E G G I V L S V E S M K R L N S L	
601	CTCAATATCCCAGAAAAGTGTCTGAACAGGGAGGGATGATTGGAAGATATCTGAAGAT	660
	L N I P E K C P E Q G G M I W K I S E D	
661	AAACAGCTAGCAGTTTGCCTGAAATATGCTGGAGTATTTGCAGAAAATGCAGAAGATGCT	720
	K Q L A V C L K Y A G V F A E N A E D A	
721	GATGAAAAGATGTATTTAATACCAAATCTGTGGGCTTTCTATTAAAGAGGCAATGACT	780
	D G K D V F N T K S V G L S I K E A M T	
781	TATCACCCCAACCAGGTAGTAGAAGGCTGTTGTTTCAGATATGGCTGTTACTTTTAATGGA	840
	Y H P N Q V V E G C C S D M A V T F N G	
841	CTGACTCCAAATCAGATGCATGTGATGATGTATGGGGTATACCGCCTTAGGGCATTG	900
	L T P N Q M H V M M Y G V Y R L R A F G	
901	CATATTTTCAATGATGCATTTGGTTTCTTACCTCCAAATGGTTCTGACAATGACTGAGAA	960
	H I F N D A L V F L P P N G S D N D *	
961	GTGGTAGAAAAGCGTGAATATGATCTTTGTATAGGACGTGTGTTGTCTATTATTGTAGTA	1020
1021	GTAACATCATATCCAAATACAGCTGTATGTTTCTTTTCTTAATTTGGTGGCACTGG	1080
1081	TATAACCACACATTAAAGTCAGTAGTACATTTTAAATGAGGGTGGTTTCTTTTAA	1140
1141	ACACATGAACATTGTAAATGTGTTGGAAAGAAGTGTTTAAAGAAATAAATTTTGCAAA	1200
1201	AAACTATTAAATAATATTATATGTGATAAATCTAAATTATGAACATTAGAAATCTGTGG	1260
1261	GGCACATATTTTGTCTGATTGGTTAAAAAATTTAACAGGTCTTTAGCGTCTAAGATAT	1320
1321	GCAATGATATCTCTAGTTGTGAATTTGTGATTAAAGTAAACCTTT	

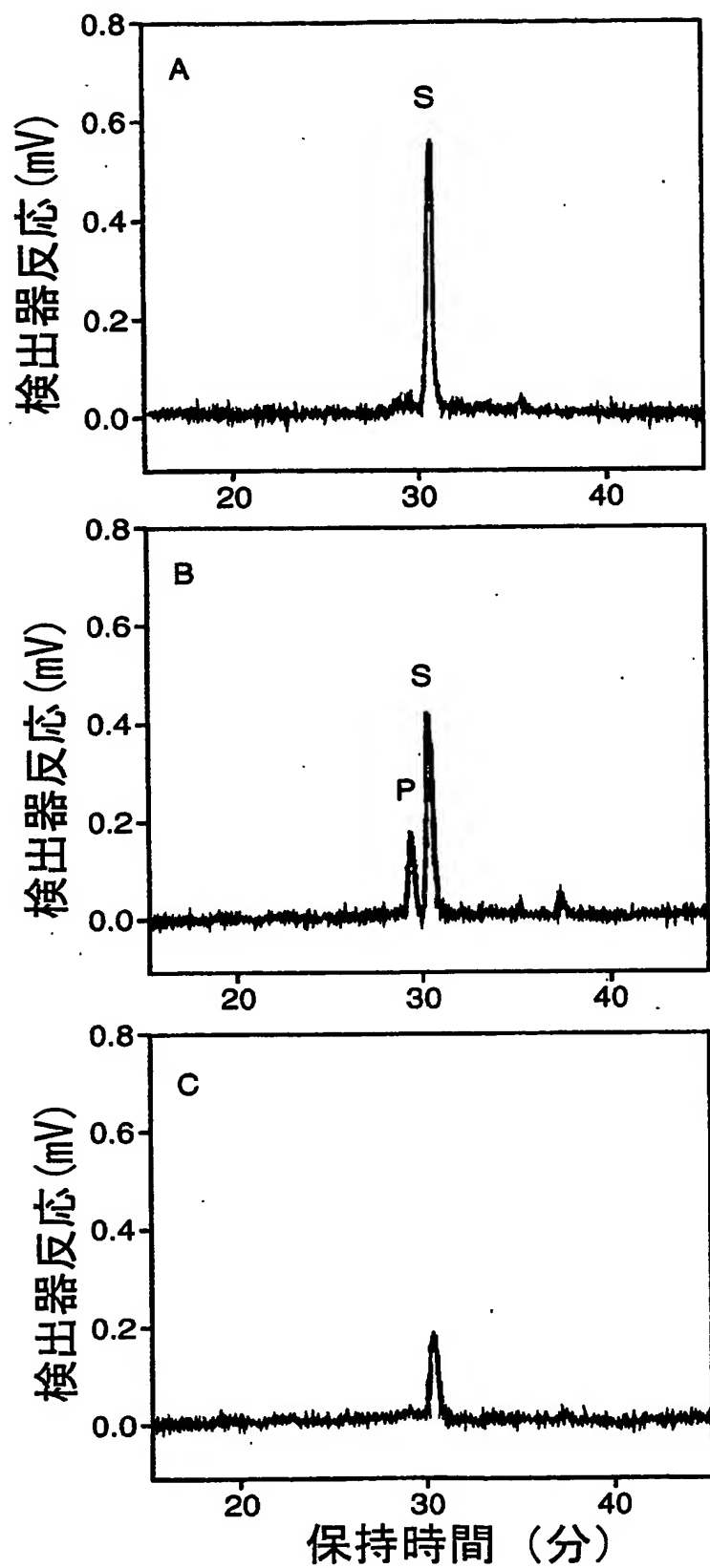
【図 2】

C1Gal-T1	MASKSWLNFLTFLCGSAIGFLLQSOLEFSILLGEKVDTQPNVLHNDPHARHSDDNGQNHLE
C1Gal-T2	MLSES-----SSFLKGVMGLGSIFCALIT--MLGHIRIGHGNRMHHHEHHHLQAPNK----E
	* * * * *
C1Gal-T1	GQMNFNADSSQHKDENTDIAENLYQKVRILQVMTGPQNLEKKAKHV KATWAQRQNKVLF
C1Gal-T2	DILKISED-----E-R--ME-LSKSFRVYQILVKPKDVSLWAA-VKETWTKHQKAEF
	* * * * *
C1Gal-T1	MSSEENKDFPAVGLKTKEGRDQLYWKTIKAFQYVHEHYLEDADWFLKADDDTYVILDNLR
C1Gal-T2	FSSENVKVFESINMDTN---DMWLMMRKAYKYAFDKYRDQYNWFFLARPTTFAIENLK
	*** * * * *
C1Gal-T1	WLLSKYDPEEPIYFGRRFKPYVKQGYMSGGAGYVLSKEALKRFVDAFKT-DKQTHSS---
C1Gal-T2	YFLLKKDPSQPFYLGHTIK-SGDLEYVGMEGGIVLSVESMKRLNSLLNIPEKQPEQGGMI
	* * * * *
C1Gal-T1	--SIEDLALGRQMEIMNVEAGDSRDTIGKETFPFVPEHHLIKGYLPRTFWYWNYYNPP
C1Gal-T2	WKISEDKQLAVQLKYAGVFAENAEDADGKDVFNKTSVGLSIKEAMT-----YHPN
	* * * * *
C1Gal-T1	VEGPGCCSDLAVSFHYVDSTTMYELEYLVYHLRPYGYLYRYQPTLPERILKEISQANKNE
C1Gal-T2	QVVEGCCSDMAVTFNGLTPNQMHVMMYGVYRLRAFGHIFNDALVFLP-----P-NGSDND
	***** * * * *
C1Gal-T1	DTKVKLGNP
C1Gal-T2	-----

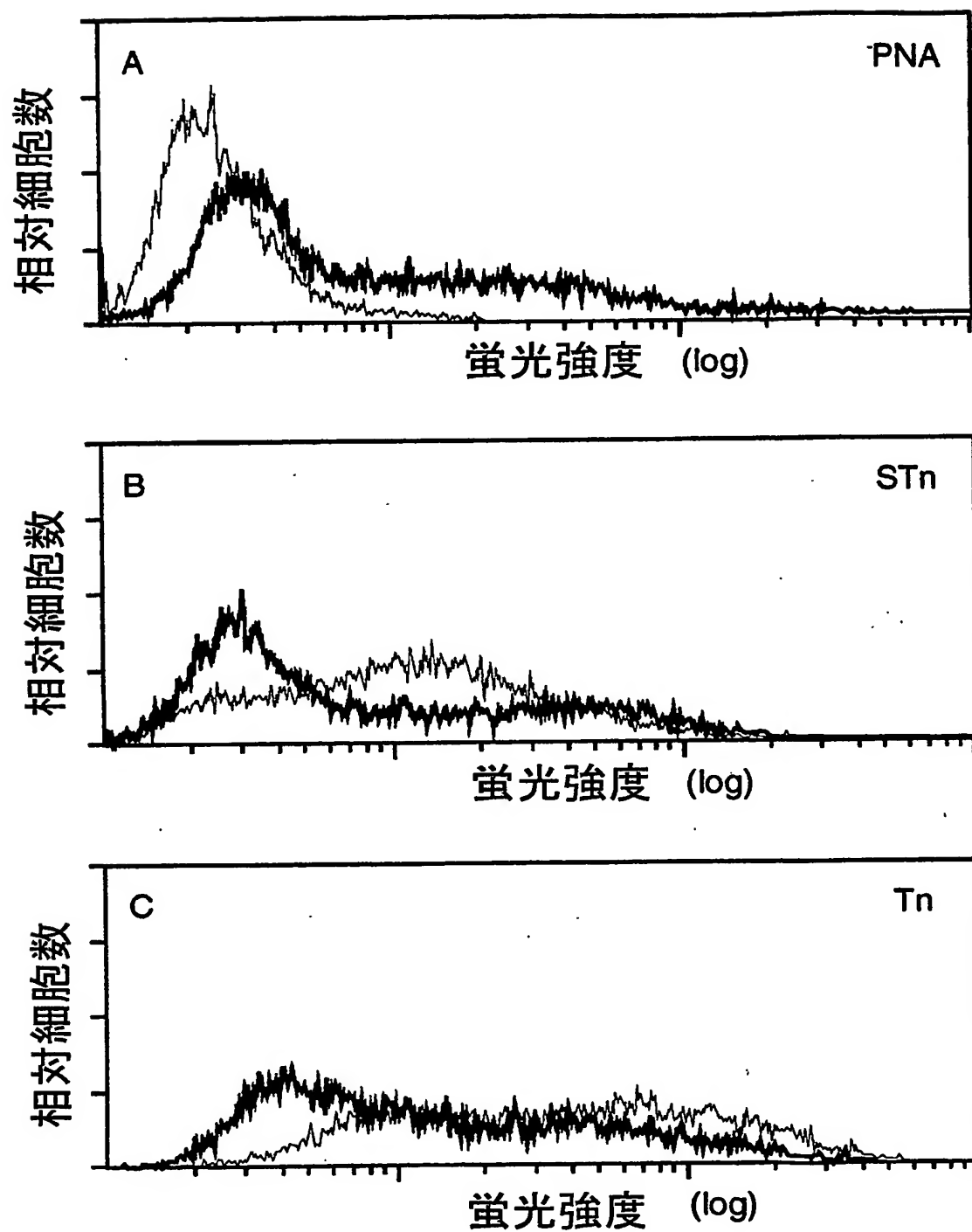
【図3】



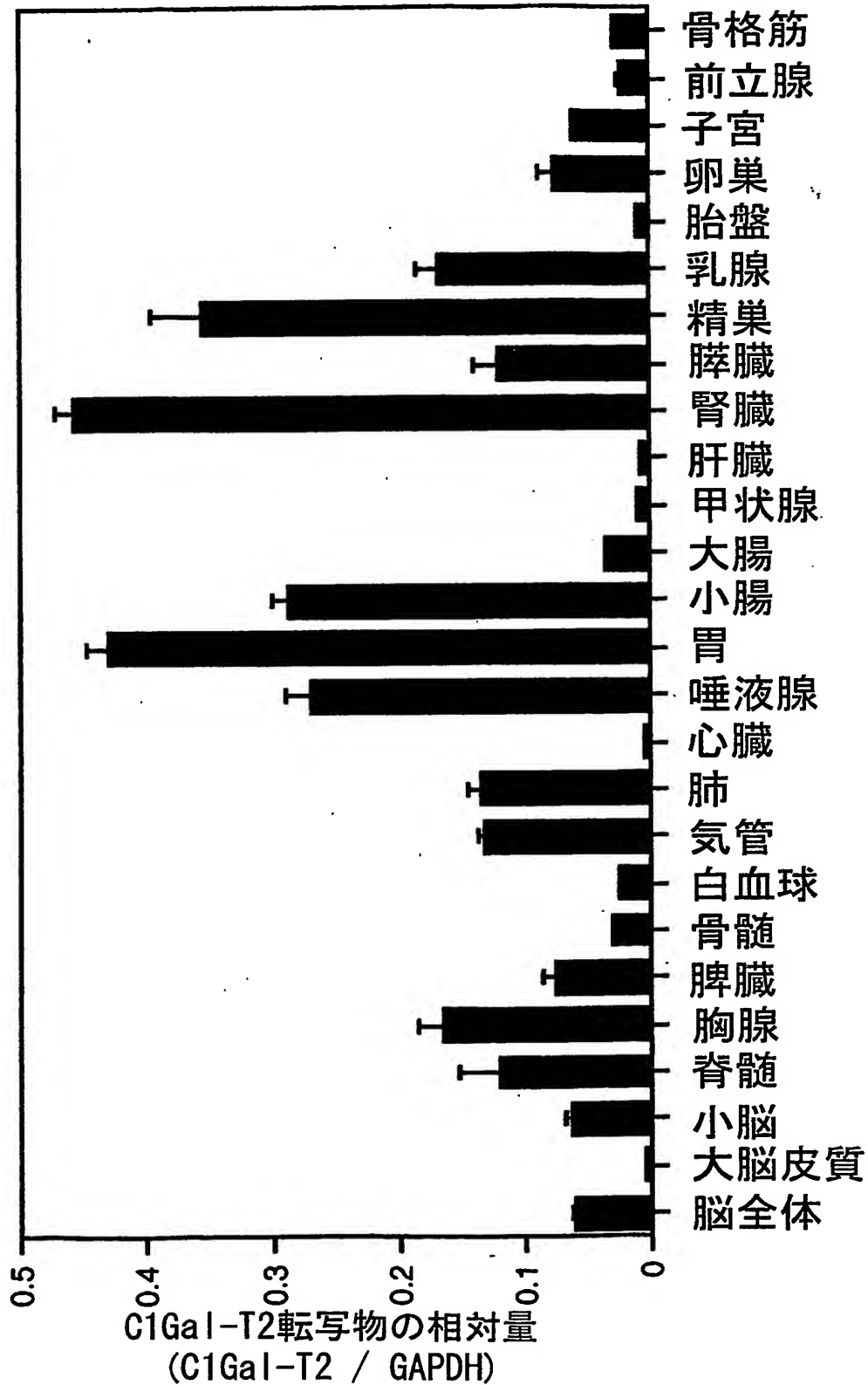
【図4】



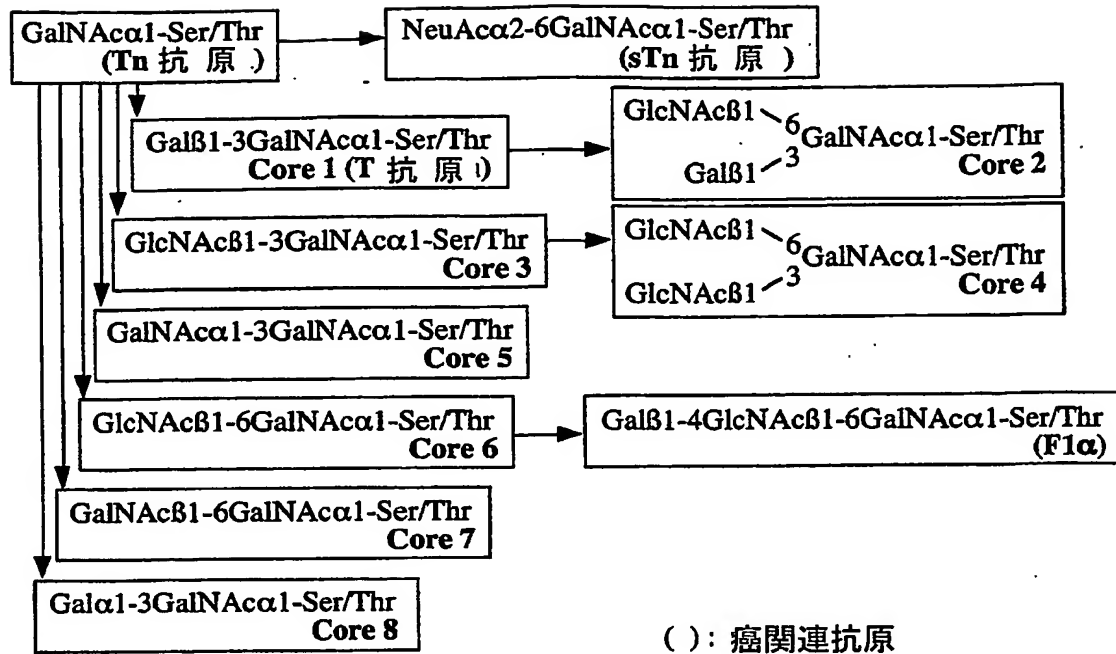
【图 5】



【図 6】

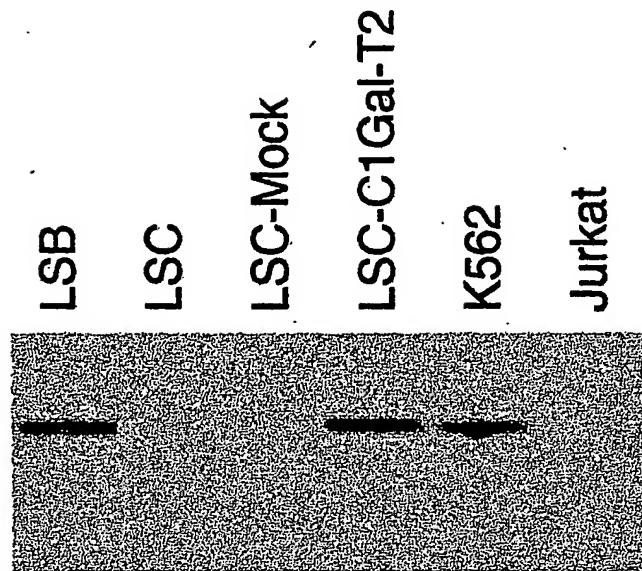


【図 7】

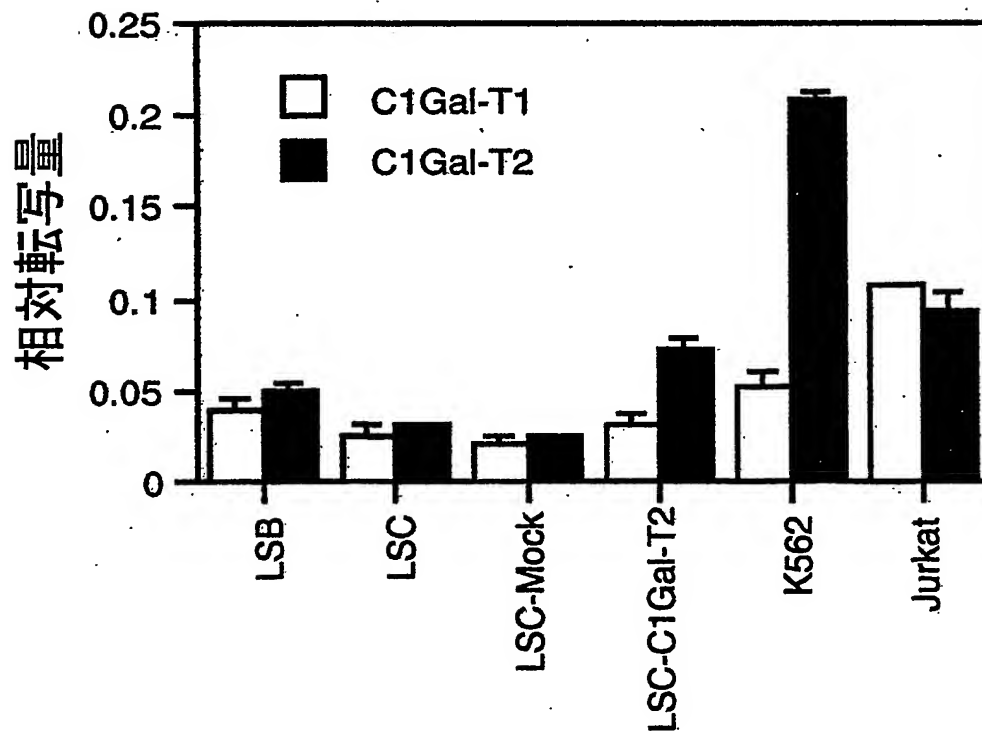


【図 8】

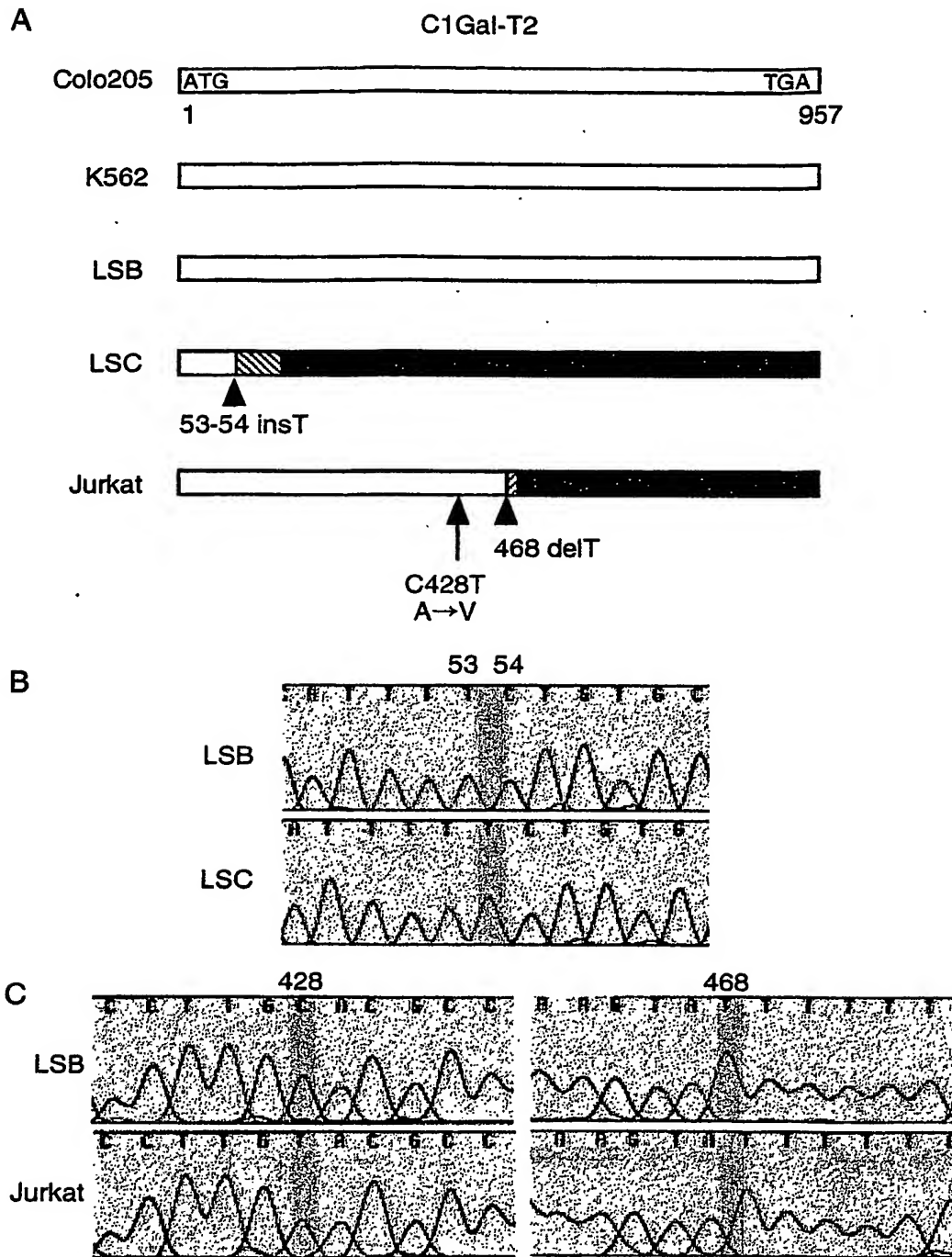
A



B



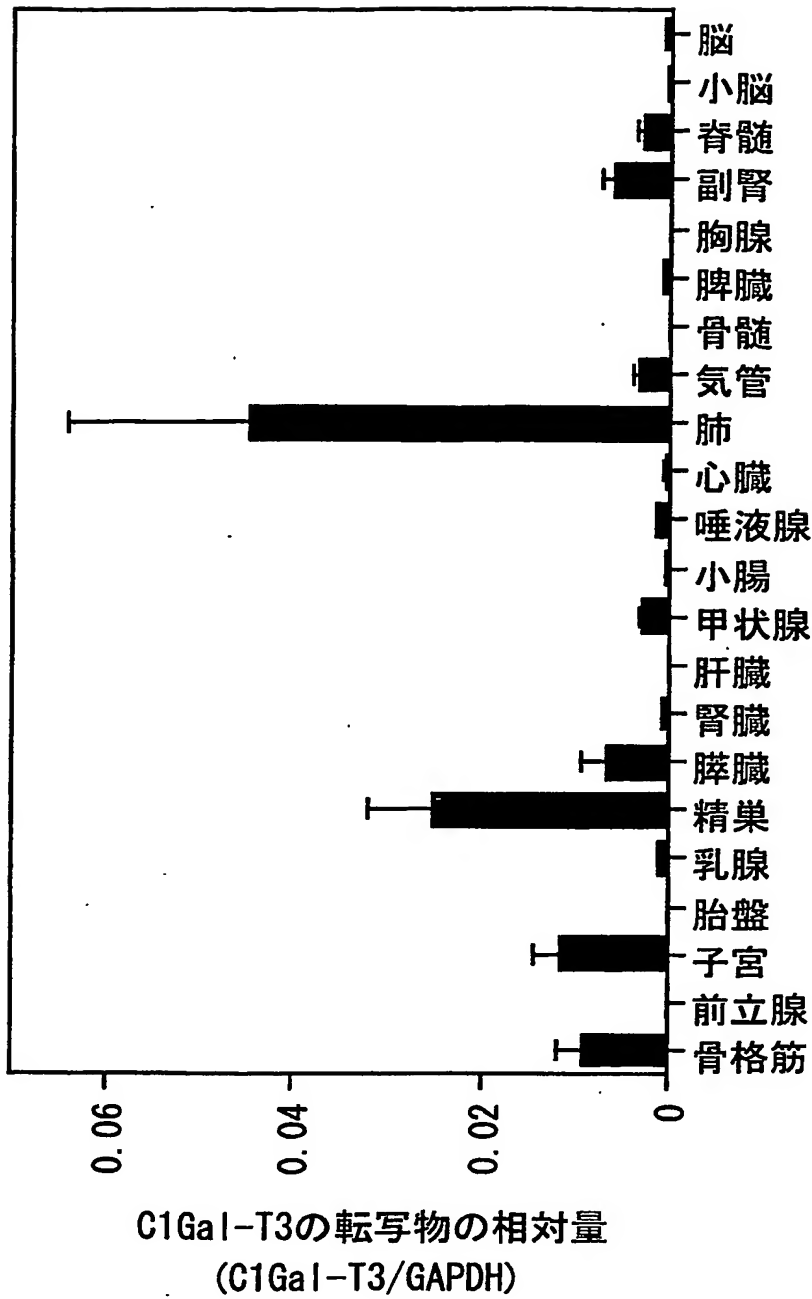
【図 9】



【図10】

C1Gal-T3	1'	MVSASGTSFFKGMLLGSISWVLITMFGQIHIRHRGQTQDHEHHHLRPPNRNDFLNTSKVI
C1Gal-T2	1"	MLSESSSFLKGVMLGSIFCALITMLGHIRIGHGNRMHHHEHHHLQAPNKEDILKISEDE
		*** **
C1Gal-T3	61'	LLELSKSIRVFCIIFGESEDESYWAVLKETWTKHCOKAELYDTKNDNLF---NIESNDRW
C1Gal-T2	60"	RMELSKSFRVYCIILVKPKDVSLLAAVKETWTKHCOKAEFFSSENVKVFESINMDTNDMW
		***** **
C1Gal-T3	118'	VQMRATYKYVFEKYGDYNWFFLALPTTFAVIENLKYLLETRDASQPFYLGHTVIFGDLE
C1Gal-T2	120"	LMMRKAYKYAFDKYRDQYNWFFLARPTTFAIENLKYLLEKDPSPQPFYLGHTIKSGDLE
		** *****
C1Gal-T3	178'	YVTVEGGIVLSRELMKRLNRLLDNSETCADQ-SVIWKLSEDKQLAICLKYAGVHAENAED
C1Gal-T2	180"	YVGMEGGIVLSVESMKRLNRLNIPKCEQGGMIWKISEDKQLAVCLKYAGVFAENAED
		** *****
C1Gal-T3	237'	YEGRDVFNTKPIAQLIEEALSNNPQQVVEGCCSDMAITFNGLTPQKMEVMMYGLYRLRAF
C1Gal-T2	240"	ADGKDVFNKTSVGLSIKEAMTYHPNQVVEGCCSDMAVTFNGLTPNQMHVMMYGVYRLRAF
		* *****
C1Gal-T3	297'	GHYFNDDLVLPPVGSEND
C1Gal-T2	300"	GHIFNDALVLPPNGSDND
		** *****

【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規ガラクトース転移酵素を同定することを目的とする。また、該酵素の用途を提供することを目的とする。

【解決手段】 957bpのORFからなる新規ガラクトース転移酵素C1Gal-T2、および948bpのORFからなる新規ガラクトース転移酵素C1Gal-T3の同定に成功した。該酵素は、コア1糖鎖(ガラクトース β 1-3アセチルガラクトサミニル α 1-R)の合成酵素であることが示唆された。該酵素やそれらをコードするポリヌクレオチドは、該酵素の発現や機能の異常に起因する疾患に対する好適な治療薬となるものと期待される。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[301021533]

1. 変更年月日 2001年 4月 2日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都千代田区霞が関1-3-1
氏 名 独立行政法人産業技術総合研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.